

Schwefel-Mobilisierung bei

Acidianus ambivalens

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Karin Lauber

aus Erbach

1. Berichterstatter: PD Dr. Arnulf Kletzin
Mikrobiologie, TU Darmstadt

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Eingereicht am: 10.02.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2006

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik unter Leitung von PD Dr. Arnulf Kletzin in der Zeit vom 18. November 2002 bis 18. November 2004 und 15. Januar 2005 bis 31. Dezember 2005 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Erbach, den 10.02.2006

(Karin Lauber)

Für meine Familie

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen und für die zeitweise Finanzierung;

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für den Freiraum bei der Gestaltung meiner Arbeit;

Den Mitgliedern der AG Pfeifer, insbesondere meinen Kollegen Sandra, Fabi und Sandro danke ich für das gute Arbeitsklima und eine schöne Laborzeit;

Franziska Lang danke ich für die geleistete Arbeit im Rahmen Ihres Forschungspraktikums;

Dr. Alexander Treusch danke ich für die teilweise Korrektur der Arbeit;

Insbesondere meinem Vater danke ich für die vollständige Korrektur der Arbeit;

Meinen Eltern möchte ich für Ihre ständige Unterstützung und Rücksichtnahme danken. Ohne Euch hätte ich dies alles nie geschafft!

Weiterhin möchte ich meiner Schwester Britta danken, die mir zeigte, dass es auch noch ein Leben neben der Arbeit gibt.

Liisa und Mona danke ich für Ihre Bemühungen, mir die finnische und schwedische Sprache nahe zu bringen; kiitosia paljon / tack så mycket – es hat sehr viel Spaß gemacht;

Frau Rohr danke ich für die genaue Erläuterung der Promotionsordnung, Ihre Ermutigungen und Ihre sehr kompetente und freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

Name Karin Lauber

Geburtstag 23.11.1975

Geburtsort Frankfurt / Höchst

Schulbildung 1982 – 1986 Astrid-Lindgren Grundschule, Dietzenbach
1986 – 1989 Heinrich-Mann-Gesamtschule, Dietzenbach
1989 – 1992 Adolf-Reichwein-Realschule, Heusenstamm
1992 Realschulabschluss
1992 – 1996 Adolf-Reichwein-Gymnasium, Heusenstamm
1996 Abitur

Akademische Ausbildung 1996 - 2002 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
2002 Diplomprüfung
2002 Diplomarbeit bei PD Dr. A. Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt
2002 - 2006 Promotionsarbeit bei PD Dr. A. Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG	3
III	MATERIAL UND METHODEN	13
1	Material	13
1.1	Organismen und Plasmide	13
1.2	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	13
1.3	Puffer und Lösungen	14
1.4	Medien	15
1.5	Synthetische Oligonukleotide	16
2	Wachstum und Fraktionierung	17
2.1	Anzucht und Ernte	17
2.1.1	<i>Acidianus</i>	17
2.1.2	<i>Sulfurisphaera</i> und <i>Sulfolobus</i>	17
2.2	Wachstumsanalyse	17
2.3	Fraktionierung.....	18
2.4	Wachstum von <i>Acidianus ambivalens</i> im Dialyseschlauch	18
3	Proteine	19
3.1	Isolierung von Proteinen	19
3.1.1	Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand	19
3.1.2	Proteinisolierung über Säulen	19
3.1.3	Proteinisolierung aus dem Schwefel	20
3.1.4	Isolierung von S-Layern	20
3.2	Untersuchung von Proteinen	20
3.2.1	Proteingehaltsbestimmung	20
3.2.2	Fällung von Proteinen	21
3.2.3	Glykosylierung	23
3.2.4	Nachweis von Eisen-Schwefel-Zentren	23
3.2.5	Identifizierung von Proteinen	24
3.3	Gele, Blots und Färbungen	24
3.3.1	SDS-PAGE	24
3.3.2	Semi-dry-blot	25
3.3.3	Western-Blot	25
3.3.4	Silberfärbung	26
3.4	Funktionstest	27

4 DNA	27
4.1 DNA-Analysen	27
4.1.1 Konzentrationsbestimmung	27
4.1.2 Agarose-Gele	28
4.1.3 Aufreinigung von DNA	28
4.2 Nachweis zur Kultur-Reinheit	29
4.2.1 16S PCR	29
4.2.2 ARDRA	29
4.3 Hergestellte Konstrukte	30
4.3.1 Insert-DNA	30
4.3.2 pMAL-p2X und pMAL-c2X	31
4.3.3 pET28c	32
4.3.4 pTYB4	33
4.3.5 Größen der Konstrukte und Vektoren	34
4.4 DNA-Klonierung	34
4.4.1 Herstellung chemokompetenter Zellen	34
4.4.2 PCR	35
4.4.3 Restriktionsspaltung	35
4.4.4 Ligation	35
4.4.5 Transformation	36
4.4.6 Plasmidisolierung	36
4.4.7 Kolonie-PCR	36
4.5 Sequenzierung	37
4.6 Nachweis von <i>sbp</i> -DNA	38
4.6.1 Herstellung einer <i>sbp</i> -DNA-Sonde	38
4.6.2 Southern-Hybridisierung	38
5 Expression in <i>E. coli</i>	39
5.1 Expression	39
5.1.1 Expression in BL2-Zellen	39
5.1.2 Expression in TB1-Zellen	39
5.2 Zellfraktionierung	40
5.2.1 Fraktionierung bei pTYB4- und pET28c-Konstrukten	40
5.2.2 Fraktionierung bei pMAL-c2X-Konstrukten	40
5.2.3 Fraktionierung bei pMAL-p2X-Konstrukten	40
5.3 Säulenaufreinigung von Fusionsproteinen	40
5.3.1 Chitin-Beads-Säulen	40
5.3.2 Amylose-Säulen	41
6 RNA-Analysen	41
6.1 Isolierung von RNA aus <i>Acidianus</i>	41
6.2 Northern-Analysen	42
6.3 Primerextension	43
7 Schwefelverbindungen	43
7.1 Colorimetrische Bestimmungen	43

7.1.2 Cyanolyse	43
7.1.2 Sulfid-Gehaltsbestimmung	44
7.1.3 Sulfid-Gehaltsbestimmung	44
7.1.4 Schwefel-Gehaltsbestimmung	44
7.1.5 Sulfat-Gehaltsbestimmung	45
7.1.6 XAD-Säulenaufreinigung	45
7.1.7 Berechnungen und Diagramme	45
7.2 Dünnschichtchromatographie	46
IV ERGEBNISSE	47
1 Schwefelverbindungen	47
1.1 Wachstum	47
1.1.1 Physiologische Untersuchungen	47
1.1.2 Überprüfung der Kulturreinheit	49
1.2 Detektion von Schwefelverbindungen im Kulturüberstand bei aeroben Wachstum ...	51
1.2.1 Wachstum mit Schwefel	51
1.2.2 Wachstum mit Tetrathionat	55
1.2.3 Wachstum mit verschiedenen Tetrathionat-Konzentrationen	59
1.2.4 Wachstum mit Tetrathionat und Schwefel	62
1.2.5 Wachstum mit Thiosulfat oder ohne verwertbare Schwefelverbindungen	65
1.3 Wachstum von <i>Acidianus ambivalens</i> im Dialyseschlauch	66
2 Das Schwefel-Binde-Protein (SBP)	67
2.1 Proteine des Kulturüberstandes	67
2.1.1 Proteinisolierung	67
2.1.2 Verwendung von Säulen	69
2.2 Schwefelgebundene Proteine	71
2.2.1 Isolierung des Schwefel-Binde-Proteins (SBP)	71
2.2.2 Isolierung von SBP mittels Detergenzien	73
2.2.3 Bestimmung der SBP-Sequenz	74
2.2.4 Sequenzvergleich des SBP	81
2.2.5 Glykosylierung	82
2.2.6 Deglykosylierung	83
2.2.7 Eisen und Färbung	84
2.2.8 Fällung des SBP	86
2.3 Isolierung von S-Layern	87
3 sbp-Überexpression in <i>E. coli</i>	88
3.1 Klonierung	88
3.2 Expression	88
3.2.1 Expression von pTYB4-SBP in BL21-Zellen	88
3.2.2 Expression von pET28c-SBP in BL21-Zellen	89
3.2.3 Expression von pMAL-c2X-SBP in TB1-Zellen	91
3.2.4 Expression von pMAL-p2X-SBP in TB1-Zellen	93
4 Funktionstest	94

5	Kopienzahl des <i>sbp</i>	95
6	RNA-Analysen	96
6.1	Nachweis von <i>pol</i> -RNA mittels Northern-Analyse	96
6.2	Primer-Extension	97
V	DISKUSSION	99
1	Schwefelverbindungen	99
2	Das Schwefel-Binde-Protein	106
3	Expression in <i>E. coli</i>	116
4	Funktionstest	116
5	Kopienzahl des <i>sbp</i>	117
6	RNA-Analysen	117
7	Fazit	118
VI	ABKÜRZUNGEN	121
VII	LITERATUR	122
VIII	ANHANG	132
1	Nukleotidsequenz des contigs 275 mit daraus resultierender Aminosäuresequenz	132
2	Find Pept (EXPASY)	135
2.1	SBP gegen MALDI-TOF-Analyse Nr. 7	135
2.2	SBP gegen MALDI-TOF-Analyse Nr. 8	136
3	Glyco-Mod (EXPASY)	138
3.1	N-glykosidische Regionen im SBP	138
3.2	O-glykosidische Regionen im SBP	139
4	Blast (EXPASY) und GCG-Peptide-Sort (Accelys)	140
5	Vergleich der Signalsequenzen von SBP und SSO	142

I Zusammenfassung

Acidianus ambivalens ist ein hyperthermophiles Crenarchaeon der Ordnung Sulfolobales, welches aerob Schwefel oxidieren kann. Da das Schwefel-oxidierende Enzym im Cytoplasma lokalisiert ist, muss der Schwefel außerhalb der Zelle aktiviert und für die im Cytoplasma stattfindenden Reaktionen in die Zelle transportiert werden. Die Schwefelmobilisierung wurde in dieser Arbeit näher analysiert.

Zunächst wurde das Wachstum mit alternativen Substraten, Tetrathionat und Thiosulfat, untersucht, die ein wichtiges Zwischenprodukt der Schwefelmobilisierung darstellen könnten. Die Zellen wuchsen nicht mit Thiosulfat wohl aber mit Tetrathionat. Hohe Konzentrationen an Trithionat wurden beim Wachstum mit Tetrathionat gebildet, nicht aber beim Wachstum mit Schwefel. Weiterhin bildeten die Zellen signifikante Mengen an Schwefel, der hydrophiler als elementarer Schwefel war. Tetrathionat wurde von Kulturen bei Wachstum mit Mischsubstraten bevorzugt abgebaut und Tetrathionat-adaptierte Zellen wuchsen nur schlecht mit Schwefel. Tetrathionat kam somit nicht als Intermediat des aeroben Schwefelstoffwechsels in Frage.

In Kulturüberständen und Schwefelsediment nach Kulturwachstum wurde nach sekretierten Proteine gesucht. Spezifisch nur im Schwefelsediment nach aeroben Wachstum mit Schwefel wurde ein Protein gefunden, welches Schwefel-Binde-Protein (SBP) genannt wurde. Das SBP war stark glykosyliert und hatte eine bräunliche Färbung in Lösung, welche mit einer hohen Eisenkonzentration einering. Der Edmann-Abbau ergab eine Mischsequenz, welche mit einem Serin startet. Sie zeigte eine Übereinstimmung mit einem Fragment, genannt contig 275 der internen partiellen Genomsequenz-Datenbank von *Acidianus ambivalens*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz war 310 Aminosäuren lang ($\approx 34,1$ kDa) und zeigte mehrere vorhergesagte Glykosylierungsstellen.

Vier Methion-Codons in Abständen von 4, 8, 30 und 41 Aminosäuren wurden stromauf des sbp-Gens identifiziert.

Eine Primerextensions-Analyse zeigte, dass der Transkriptionsstartpunkt 9 nt vor dem zweiten Methionin lag. Vor dem Transkriptionsstart lagen im archaea-typischen Abstand eine TATA-Box und ein BRE. Die 30 Aminosäuren stromauf vom Protein hatten die typischen Zusammensetzung eines sekretorischen Signalpeptids, mit N-Domäne mit zwei Lysinen als Sequenzmotiv und einer hydrophoben H-Domäne vorhergesagter α -Helix.

Es wurde versucht die sbp-Region in *E. coli* überzuexprimieren. und das Protein mittels Säulenchromatographie aufzureinigen aber mit negativen Resultaten. Auch Western-Analysen gaben keine Ergebnisse.

Eine Southern-Hybridisierung des Genoms von *Acidianus ambivalens* ergab drei unabhängige Banden, was eine dreifache Kopienzahl des sbp im Genom vermuten läßt.

Northern-Hybridisierungen ergaben, dass die sbp-RNA während der kompletten Wachstumsphase der Zellen beim aeroben Schwefelstoffwechsel gebildet wird. Die RNA war viermal länger als erwartet. Dies deutet darauf hin, dass das sbp in einem Operon mit mehreren Gene noch nicht identifizierten Genen liegt.

II Einleitung

In dieser Arbeit sollte der extrazelluläre Teil des aeroben Schwefelstoffwechsels von *Acidianus ambivalens* näher untersucht werden. Insbesondere sollte dabei die Schwefelmobilisierung in diesem Prozess geklärt werden.

Acidianus ambivalens ist fakultativ anaerob, hyperthermophil (Wachstumstemperatur = 60 – 95° C, $T_{\text{Opt.}} = 80^\circ \text{C}$) und extrem acidophil ($\text{pH} = 1 - 4$, $\text{pH}_{\text{Opt.}} = 2,5$). Die DNA besitzt einen GC-Gehalt von 31% und eine unregelmäßig kokkoide Form mit einem Durchmesser von 0,8 – 2,0 μm (Zillig *et al.*, 1985, 1986, Fuchs *et al.*, 1996). Es wurde aus Solfataren Islands isoliert und kann sowohl unter aeroben, wie auch anaeroben Bedingungen mit elementarem Schwefel wachsen (Zillig *et al.*, 1985). *Acidianus* gehört wie auch die Gattungen *Sulfolobus* und *Sulfurisphaera* zu den Sulfolobales (Abb.1).

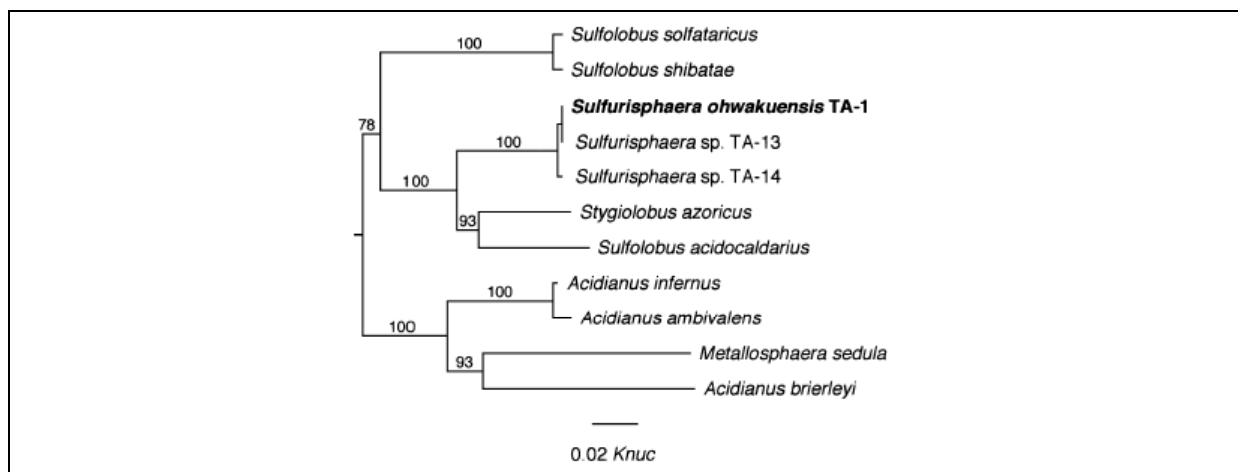


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum, basierend auf den 16S rRNA-Sequenzen (Kurosawa *et al.*, 1998).

Die Sulfolobales und die hyperthermophilen Thermoproteales leben in terrestrischen vulkanischen Biotopen. Sie sind mit den hyperthermophilen Desulfurococcales aus submarinen vulkanischen Biotopen und den kälteliebenden Stämme aus nährstoffarmen Meeren zu den Crenarchaeoten zusammengefasst. Die Crenarchaeoten leben zumeist in neutralen bis sauren Biotopen, wo sie Schwefel umsetzen (Madigan *et al.*, 2001). Sie gehören zu einem der vier Reiche der Archaea (Abb.2).

Die Archaea sind eine eigenständige Domäne, neben den Bacteria und Eukarya (Woese *et al.*, 1990; Woese, 2000, 2002). Sie besiedeln besonders extreme Standorte, wie heiße Quellen, Salzseen, Vulkane oder Eis und werden in vier Reiche unterteilt: Korarchaeoten, Nanoarchaeoten, Euryarchaeoten und die eben vorgestellten Crenarchaeoten (Abb.2).

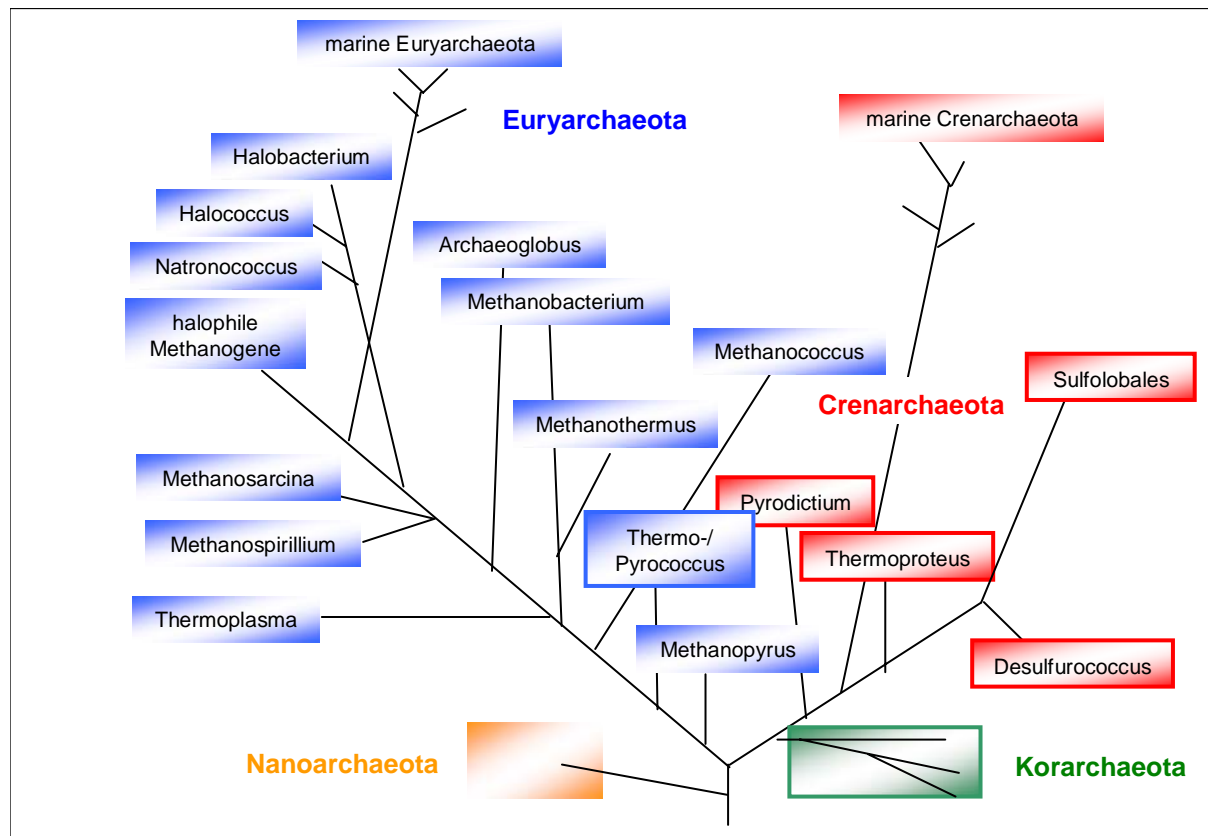


Abbildung 2: Stammbaum der Archaea basierend auf 16S rRNA-Analysen (verändert nach Madigan *et al.*, 2001a). **Blau** = Euryarchaeota, **rot** = Crenarchaeota, **grün** = Korarchaeota, **orange** = Nanoarchaeota, umrandet sind Gruppen, in denen Schwefel-verwertende Organismen vorkommen.

Die Korarchaeoten leben in eisen- und schwefelreichen Quellen. Die Nanoarchaeota leben in kalten Schwefelquellen, in Assoziation mit anderen Archaea, wie beispielsweise *Nanoarchaeum equitans* mit *Ignicoccus* (Huber *et al.*, 2002). Die Euryarchaeoten beinhalten halophile (bsp. *Halobacterium*), methanogene (bsp. *Methanosarcina*) und hyperthermophile (bsp. *Thermococcus*, *Ferroplasma*) Gattungen.

Elementarer Schwefel (S^0) ist ein nichtmetallisches chemisches Element mit einem Molekulargewicht von 32,07 g/mol. Es liegt in reiner Form bis 95,6° C in gelben rhombischen Kristallen (α -Schwefel) als S_8 -Ring vor. Diese S_8 -Ringe entstehen durch kovalente Einfachbindungen zwischen acht Schwefelatomen (Schwefelblume). In Wasser ist Schwefel so gut wie unlöslich (5 µg/l, Boulège, 1978). Die feste Erdkruste enthält zu etwa 0,048% Schwefel. Im Boden sind Schwefelverbindungen mit Metallen, wie Eisen (Pyrit, FeS_2), Kupfer (Kupferkies, $CuFeS_2$), Blei (Bleiglanz, PbS), Zink (Zinkblende, ZnS), Calcium (Gips, $CaSO_4 \cdot xH_2O$), Magnesium (Bittersalz, $MgSO_4 \cdot xH_2O$) und Natrium (Glaubersalz, $Na_2SO_4 \cdot xH_2O$) vorhanden (Mortimer, 1996). Aber auch Schwefelgase, wie Schwefelwasserstoff (H_2S) und Schwefeldioxid (SO_2) und fossile Schwefelverbindungen, wie Erdöl und Erdgas kommen in der Natur vor. Die wichtigste Funktion besitzt der Schwefel

als SH-Gruppe in Coenzymen, als Bestandteil von Methionin und Cystein, sowie in vielen wichtigen Verbindungen wie Vitaminen (Biotin), Antibiotika (Penicillin, Cephalosporin) und sekundären Pflanzenstoffen (Lauchöle und Senföle). Schwefel und seine Verbindungen sind sehr reaktiv, so dass es zu etlichen Spontanreaktionen kommt (Tab.1).

Tabelle 1: Beispiele für Spontanreaktionen von Schwefelverbindungen (Giggenbach, 1972; Münchow & Steudel, 1993; Oltmann & Stouthamer, 1975; Rolia & Chakrabati, 1982; Schauder & Kröger, 1993; Teder, 1971).

Verbindung	Reaktion	Bedingungen
Sulfit	Sulfit → Sulfat	aerob, wässrig
	Sulfit → Schwefeldioxid	sauer
	Sulfit + Schwefel → Thiosulfat	neutral, alkalisch
Thiosulfat	Thiosulfat → Sulfit + Sulfid	alkalisch
	Thiosulfat → Polythionat → Schwefel + Sulfit	sauer
Tetrathionat	Tetrathionat + Sulfit → Trithionat + Thiosulfat	neutral, alkalisch
	Tetrathionat + Dithionit → Thiosulfat + Sulfit	neutral
	Tetrathionat + Sulfid → Schwefel + Thiosulfat	---
Trithionat	Trithionat → Thiosulfat + Sulfat	pH = 5,5 – 12
Schwefel	Schwefel + Sulfid → Polysulfid	neutral, alkalisch
Polysulfid	Polysulfid → Schwefel + Sulfid	sauer

Sulfat (SO_4^{2-}) ist die Endoxidationsstufe des Schwefels. Ein großer Teil der in der Natur vorkommenden Schwefelverbindungen ist jedoch durch den Schwefelkreislauf von Mikroorganismen entstanden (Abb.3).

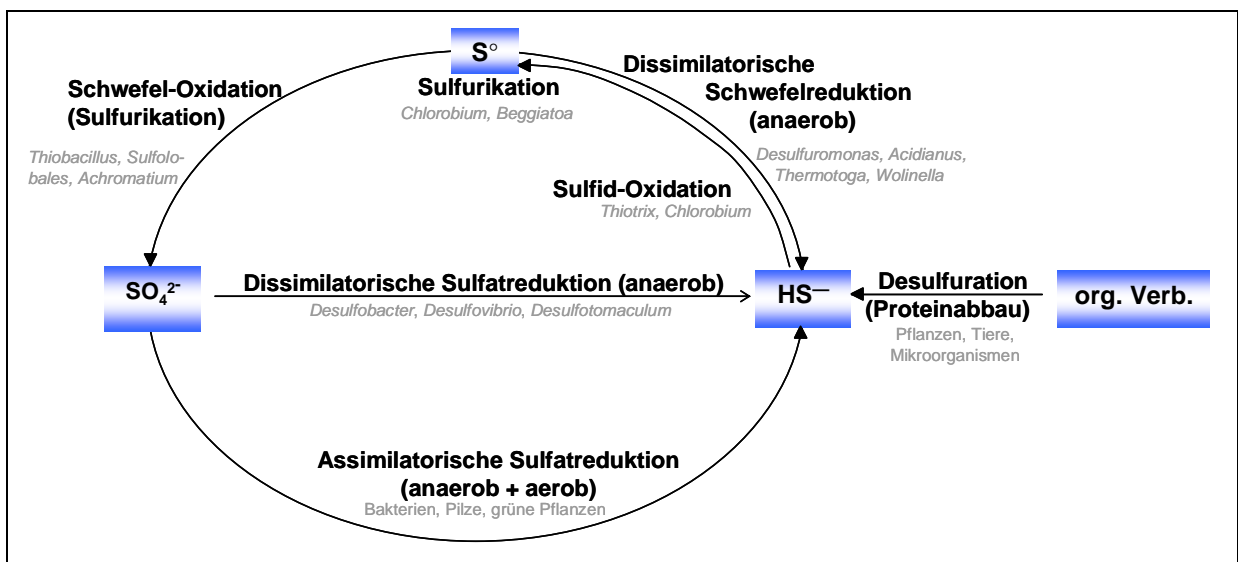


Abbildung 3: Vereinfachte Übersicht über den Schwefelstoffwechsel der Mikroorganismen (verändert nach Munk, 2001; Madigan et al., 2001; Schlegel 1991).

Die Verwendung von elementarem Schwefel als Energieresource ist anaerob durch Schwefelreduktion und aerob durch Schwefeloxidation möglich (Abb.3). Die archaealen Vertreter sind hierbei eher hyperthermophil, während es sich bei mesophilen und

thermophilen Organismen meist um Bakterien handelt (Hedderich *et al.*, 1999). Die meisten schwefel-umsetzenden Organismen beschränken sich hierbei entweder auf Schwefelreduktion oder Schwefeloxidation. Als Ausnahmen gelten *Acidianus* und einige andere Gattungen der Sulfolobales, die zwischen Schwefeloxidation und Schwefelreduktion je nach Sauerstoffverfügbarkeit wechseln können.

Die dissimilatorische Schwefelreduktion ist bei vielen unterschiedlichen Organismengruppen verbreitet (siehe Abb.3). Dabei wird elementarer Schwefel oder Polysulfid unter anaeroben Bedingungen zu Sulfid (H_2S) reduziert (Schönheit & Schäfer, 1995; Hedderich *et al.*, 1999). Als Elektronendonator werden dazu Wasserstoff oder organische Substrate benutzt.

Der am besten untersuchte „Schwefel“-Reduzierer ist *Wolinella succinogenes*, ein anaerobes Proteobakterium der ϵ -Untergruppe. Es betreibt bei neutralen pH-Werten und einer Temperatur von 37° C Polysulfidatmung. Das unter diesen Bedingungen lösliche Polysulfid fungiert hierbei als Elektronenakzeptor (Schauder & Kröger, 1993). Es kann durch Porine in das Periplasma von *Wolinella* diffundieren und bindet dort an das lösliche Sud-Protein (Lin *et al.*, 2004). Von dort wird es auf das ebenfalls lösliche Str-Protein übertragen (Klimmek, 2004). Anschließend wird das Substrat an die Polysulfidreduktase (PSR) abgegeben. Die in das Periplasma gerichtete, membrangebundene PSR gehört zur Sequenzfamilie der Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktasen. Es gibt mehrere bekannte Vertreter dieser DMSO-Familie, wie die Nitratreduktase von *E. coli* oder die Thiosulfatreduktase von *Salmonella*. Die PSR reduziert das Substrat zu H_2S , wobei Menachinol als Elektronendonator dient (Schauder & Kröger, 1993, Hedderich *et al.*, 1999).

Acidianus ambivalens betreibt unter H_2 - CO_2 -Atmosphäre anaerobe Schwefelatmung. Dabei wird elementarer Schwefel als terminaler Elektronenakzeptor mit Wasserstoff als Elektronendonator zu Schwefelwasserstoff zwecks Energiegewinnung reduziert (Abb. 4; Laska *et al.*, 2003). Dabei sind mindestens zwei Enzyme beteiligt. Die Schwefelreduktase katalysiert die Reaktion von elementarem Schwefel zu Schwefelwasserstoff. Die Elektronen und Wasserstoffatome kommen aus der Hydrogenasereaktion. Die Übertragung der Elektronen von der Hydrogenase zur Schwefelreduktase erfolgt über einen noch unbekannten Elektronenüberträger, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Chinon handelt (Laska *et al.*, 2003).

Dieses Modell (Abb.4), analog zur Polysulfidatmung von *Wolinella* entwickelt, sagt vorher, dass das Substrat (S^0) für die Reaktion nicht in die Zelle transportiert werden muss. Vielmehr spielen sich durch die nach außen gerichteten Enzyme (Hydrogenase und Schwefelreduktase) alle Reaktionen im „Pseudoperiplasma“ ab.

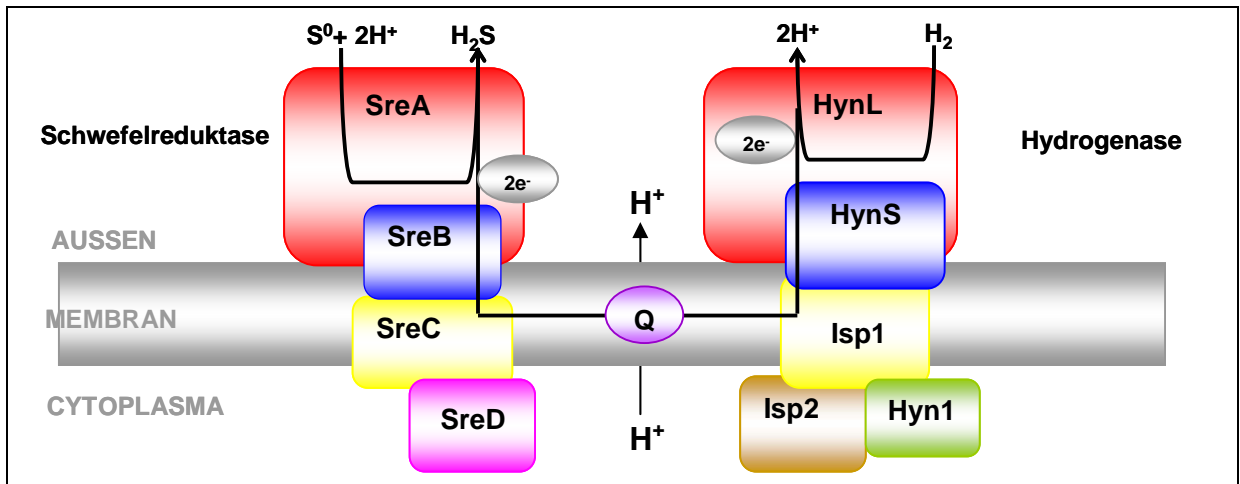


Abbildung 4: Modell der Schwefelatmung von *Acidianus ambivalens* (Laska et al., 2003). Die Pfeile geben den Transport der Elektronen an. **Q** = Chinon, **Schwefelreduktase:** SreA = große Mo-Pterin-Untereinheit, SreB = kleine FeS-Untereinheit, SreC = Membrananker, SreD = Polyferredoxin, **Hydrogenase:** HynL = große Ni-Fe-Untereinheit, HynS = kleine FeS-Untereinheit, Isp1 = Membrananker Isp2 = FeS-Protein und Hyn1 = Rieske Ferredoxin; **rot** = große Untereinheit, **blau** = kleine UE, **gelb** = Membrananker, **rosa**, **braun** und **grün** = unbekannte Funktion.

Bei der Schwefeloxidation wird elementarer Schwefel unter aeroben Bedingungen zu Sulfat (SO_4^{2-}) umgebaut. Die bekanntesten Schwefeloxidierer sind hierbei, Vertreter der früheren Gattung *Thiobacillus*. Als *Thiobacillen* wurden früher alle stäbchenförmigen schwefeloxidierenden Bakterien bezeichnet. Aufgrund der 16S rRNA-Analysen wurden diese Gruppen jedoch neu eingeordnet. Sie leben in marinen Schlamm, Böden oder warmen Quellen. Als Elektronendonoren werden am häufigsten anorganische Verbindungen, wie Sulfid oder Thiosulfat verwendet. Die energieliefernde Reaktion ist hierbei u.a. die Bildung von Sulfat über Thiosulfat. Außerdem erzeugen diese Reaktionen große Mengen an Schwefelsäure, so dass mehrere Arten, die heute zu den Acidithiobacillen gehören, acidophil sind.

Acidianus ambivalens setzt aerob elementaren Schwefel um. Als zentrales Endprodukt entsteht dabei Sulfat, welches in einem noch unbekannten Weg aus der Zelle transportiert wird (Abb.5).

Das initiale Enzym des aeroben Schwefelstoffwechsels, welches den ersten (bekannten) Schritt der Oxidation katalysiert, ist die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR). Ihre Endprodukte sind Thiosulfat, Sulfid und Sulfit. Sie ist im Cytoplasma lokalisiert, so dass der Schwefel für die stattfindenden Reaktionen mobilisiert und die entstehende Zwischenverbindung in die Zelle transportiert werden muss.

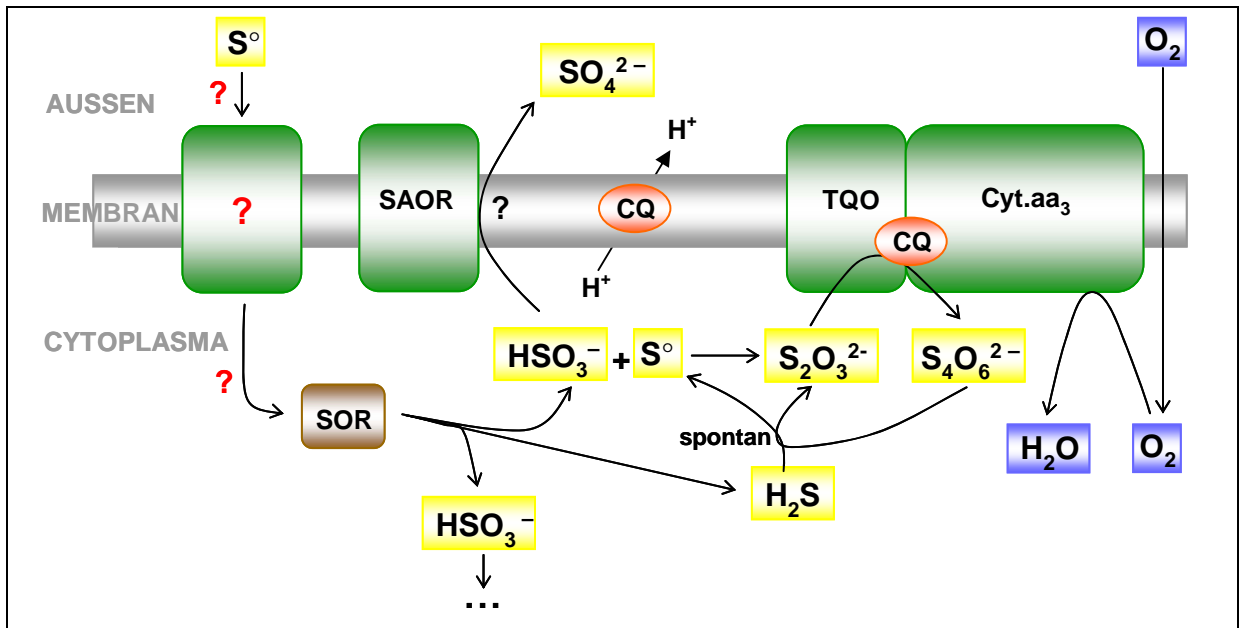


Abbildung 5: Modell des aeroben Schwefelstoffwechsels von *Acidianus ambivalens* (Kletzin *et al.*, 2004).

Braun = cytoplasmatische Proteine, **Grün** = Membranproteine, **gelb** = Schwefel & -verbindungen, **blau** = Sauerstoffaufnahme, **CQ** = Caldariella-Chinon, **Cyt.aa₃** = Terminale Oxidase, **SAOR** = Sulfat-Akzeptor-Oxidoreduktase, **SOR** = Schwefel-Oxygenase-Reduktase, **TQO** = Thiosulfat-Oxidase.

Nur bei wenigen Organismen sind Beispiele zur Schwefel-Aufnahme in die Zelle bekannt. So ist ein Schwefelbindeprotein bislang nur bei dem acidophilen Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* beschrieben. Dieses 40 kDa große Protein, bei welchem eine Adhäsion mit dem Schwefel nachweisbar ist, sitzt in der Flagelle des Organismus (Ohmura *et al.*, 1996). In extrazellulären Ablagerungen wurden höhere Polythionate gefunden (Steudel *et al.*, 1987), bei denen es sich um Produkte aus der Schwefelmobilisierung durch die Bindung des Proteins handeln könnte.

Das hyperthermophile und anaerobe Archaeon *Thermococcus tadjuricus* produziert Polysulfide und verschiedene lipophile Substanzen, aus denen Heterozyklen entstehen (Ritzau *et al.*, 1993; Abb.6).

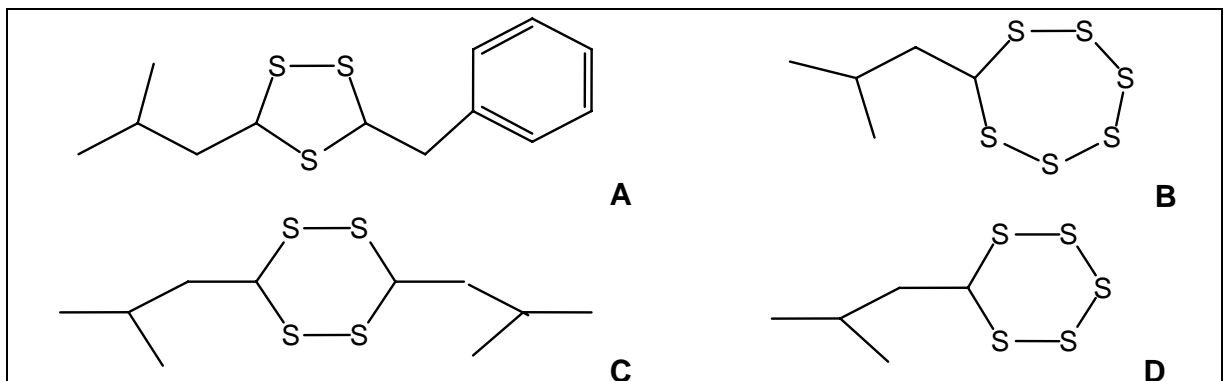


Abbildung 6: Zyklische Polysulfide aus dem Kulturüberstand des hyperthermophilen Archaeons *Thermococcus tadjuricus* (Ritzau *et al.*, 1993).

A = Isobutyl-[1,2,3,4,5]-pentathian, B = 3-Benzyl-5-isobutyl-[1,2,4]-trithiolan, C = 3,6-Diisobutyl-[1,2,4,5]-tetrathian, D = Isobutyl-[1,2,3,4,5,6]-hexathiepan.

Der thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* hingegen besitzt Pili zur Schwefelanlagerung, wodurch die kristalline Struktur des Schwefels „zerfressen“ wird (Weiss, 1973). *Thioalkalivibrio* benutzt, wie viele phototrophe anaerobe Bakterien, periplasmatische Schwefelkügelchen zur Schwefeleinlagerung (Sorokin *et al.*, 1999). Die Zusammensetzung der Schwefelkügelchen wurde bei vielen Bakterien untersucht (Guerrero, *et al.*, 1984, 1985; Hageage *et al.*, 1970; Mas & van Gemerden, 1987; Mas *et al.*, 1985 und Steudel *et al.*, 1987; Steudel, 1985, 1989) und ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. So wird einerseits behauptet, dass die Schwefelkügelchen nicht aus Cyclooctaschwefel bestehen (Prange *et al.*, 2002b; Hageage *et al.*, 1970; Steudel, 1989, Guerrero *et al.*, 1985), auch deshalb weil keine signifikanten Mengen an S₈-Schwefel gefunden wurden (George *et al.*, 2002, Then, 1984). Andererseits wird behauptet, dass in einigen Organismen, wie beispielsweise *Beggiatoa alba* und *Thiomargarita namibiensis* Cyclooctaschwefel vorkommt, während andere Organismen Polythionate (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) oder polymerischen Schwefel ablagern (*Allochromatium vinosum*, Prange *et al.*, 2002a, George *et al.*, 2002). Auch der Ort der Ablagerung ist unterschiedlich. So speichern die anaeroben Chlorobiaceen den Schwefel in Vesikeln außerhalb der Zelle, die Chromatiaceen innerhalb der Zelle (Prange *et al.*, 2002a). Dabei sind bei *Chromatium vinosum* drei Proteine bekannt, die diese Schwefelkügelchen umhüllen.

Neben Schwefel können viele Mikroorganismen auch mit Tetrathionat als Schwefelquelle wachsen (Tab.2). Die meisten dieser Organismen sind hierbei Bakterien. Das einzig bekannte Archaeon ist *Acidianus brierleyi*.

Tabelle 2: Übersicht über Tetrathionat-verwertende Organismen

(Aminuddin & Nicholas, 1974; Bowen *et al.*, 1966; Charles & Suzuki, 1966; Emmel *et al.*, 1986; Friedrich, 1998; Friedrich & Mitrenga, 1981; Hallberg & Lindström, 1994; 1996; Kelly & Harrison, 1989; Kodama, 1969; Kusai & Yamanaka, 1973a, 1973b; Lu & Kelly, 1988; Meulenberg *et al.*, 1992, 1993; Nakamura *et al.*, 1995; Schedel & Trüper, 1979; Shahak *et al.*, 1992; Shooner *et al.*, 1996; Sugio *et al.*, 1989, 1992a, 1992b; Toghrol & Southerland, 1983; Wiegel *et al.*, 1978; Whited & Tuttle, 1983).

Organismus	Metabolismus	pH	T (° C)
<i>Acidianus brierleyi</i>	obligat lithotroph	1,8	70
<i>Acidithiobacillus acidophilus</i>	fakultativ lithotroph	2,5	30
<i>Acidithiobacillus caldus</i> KU	obligat lithotroph	2,5	45
<i>Acidithiobacillus denitrificans</i>	obligat lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	obligat lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus novellus</i>	fakultativ lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	obligat lithotroph	2,5	30
<i>Acidithiobacillus perometabolis</i>	fakultativ lithotroph	6,0	30 – 35
<i>Acidithiobacillus tepidarius</i>	obligat lithotroph	7,0	44
<i>Acidithiobacillus thermosulfatus</i>	fakultativ lithotroph	5,4	51
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	obligat lithotroph	2,5	30
<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	obligat phototroph	6,8	25 – 35
<i>Chlorobium limicola</i> f. sp. <i>thiosulfatophilum</i>	obligat phototroph	7,0	30
mariner Pseudomonaden-Stamm 16B	heterotroph	7,0	30
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> GZ29	fakultativ lithotroph	8,0	30

Beim aeroben Schwefelstoffwechsel von *Acidianus ambivalens* ist bekannt, dass der zu Beginn unlösliche Schwefel während des Wachstums hydrophiler wird. Es ist anzunehmen, dass dies mit der Schwefelmobilisierung zusammenhängt.

Die oben aufgeführten Möglichkeiten einer Schwefelmobilisierung sind bei *Acidianus* jedoch nicht denkbar. *Acidianus ambivalens* besitzt weder Pili, noch heftet er sich an den Schwefel (Zillig *et al.*, 1985). Auch ist eine Speicherung von Polysulfiden bei *Acidianus* aufgrund der Bedingungen ($T = 80^\circ \text{C}$; $\text{pH} = 0,5 - 2,5$) nicht möglich, da sie rapide in Schwefel und Schwefelwasserstoff zerfallen (Schauder & Kröger, 1993). Wegen der hohen Reaktivität von Schwefelverbindungen (Tab.1; Steudel, 2000) könnten bei *Acidianus* unter aeroben Bedingungen nur Polythionate eine Rolle als Zwischenprodukte des extrazellulären Teils des aeroben Schwefelstoffwechsels in Frage kommen.

Zur Schwefelmobilisierung wurden mehrere Hypothesen aufgestellt (Abb.7).

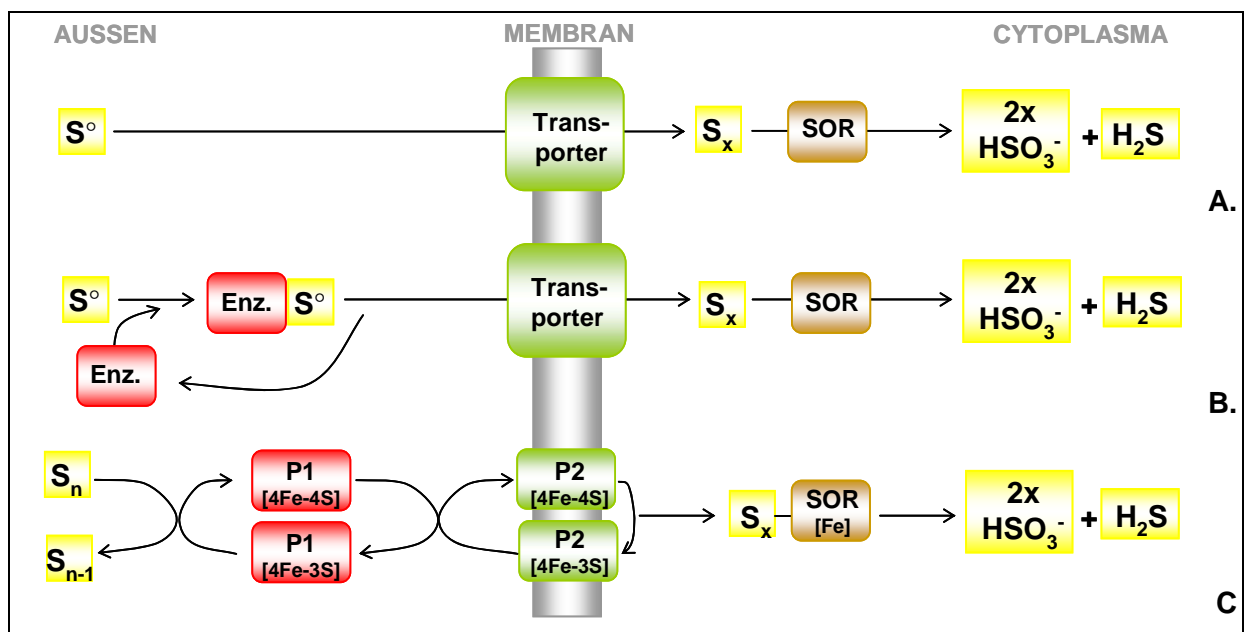


Abbildung 7: Hypothesen der Schwefelmobilisierung und -Aufnahme in die Zelle.

A. Transporter-Hypothese, **B.** Schwefel-Binde-Protein-Hypothese, **C.** FeS-Cluster-Hypothese. **Rot** = extrazelluläre Proteine, **Braun** = cytoplasmatische Proteine, **Grün** = Membranproteine, **Enz.** = Enzym, P1 & P2 = Eisen-Schwefel-Proteine, **SOR** = Schwefel-Oxygenase-Reduktase, S° = elementarer Schwefel (S_8), S_n = Schwefel mit n Schwefelatomen, S_x = Schwefelverbindung.

Elementarer Schwefel ist unter den gegebenen Bedingungen stabil. So ist eine spontane Schwefelmobilisierung unwahrscheinlich. Auch der Umsatz des Schwefels in eine transportierbare Schwefelverbindung durch ein Membranprotein (Abb.7A) ist unwahrscheinlich, da sich *Acidianus*-Zellen nachweislich nicht an den Schwefel anlagern (Zillig *et al.*, 1985), was bei einem membrangebundenen Umsatz aber von Nöten wäre.

Wahrscheinlicher ist die Hypothese eines extrazellulären Enzyms, welches explizit an den Schwefel bindet (Abb.7B). Ein solches Protein könnte den elementaren Schwefel im Medium oxidieren. Dabei könnte es sich um ein sekretiertes Protein oder einen

extrazellulären S- (*surface*) Layer handeln. Bei *Acidianus* sind bis jetzt nur S-Layer als Zellwand bekannt, jedoch gibt es auch extrazelluläre S-Layer bei *Sulfolobus* (Albers, persönliche Mitteilung). Sowohl bei sekretierten als auch bei S-Layer-Proteinen wäre eine Glykosylierung des Proteins wahrscheinlich, da Proteine, welche aus der Zelle ausgeschieden werden, häufig glykosyliert sind. Die Glykosylierung eines Proteins dient dabei vor allem dem Schutz vor Hitze (Olsen & Thomsen, 1991) und Proteasen (Langsford *et al.*, 1987). Da *Acidianus* unter hyperthermophilen Bedingungen wächst, wäre für eine enzymatisch katalysierte Schwefelmobilisierung auch ein glykosyliertes Protein von Nöten. Glykosylierte S-Layer wurden schon in mehreren Archaea wie *Halobacteria* (Nakamura *et al.*, 1992; Lechner & Wieland, 1989; Mengele & Sumper, 1992), verschiedenen *Methanothermus*-Arten (Kärcher *et al.*, 1993; Bröckl *et al.*, 1991), *Staphylothermus* (Peters *et al.*, 1995) und *Sulfolobus sp.* (Grogan, 1989; Moens & Vanderleyden, 1997), sowie in zahlreichen Bakterien (Altman *et al.*, 1990, 1992; Bock *et al.*, 1994; Lewis, *et al.*, 1987; Messner *et al.*, 1990, 1992, 1993, 1995; Messner & Sleytr, 1988; Peters *et al.*, 1987, 1992; Sleytr *et al.*, 1986) nachgewiesen. Nicht-glykosylierte S-Layer kommen hingegen nur sehr selten vor (Sandercock *et al.*, 1984). Die durch das extrazelluläre Enzym entstehende transportierbare Schwefelverbindung würde dann entweder durch Bindung an ein Membranprotein oder durch weitere extrazelluläre Proteine weiter transportiert.

Eine weitere Möglichkeit der Schwefelmobilisierung und des Transportes wäre eine Kaskade ähnlich des Isc-Clusters (Abb.8; Takahashi & Nakamura, 1999 & Tokumoto *et al.*, 2002).

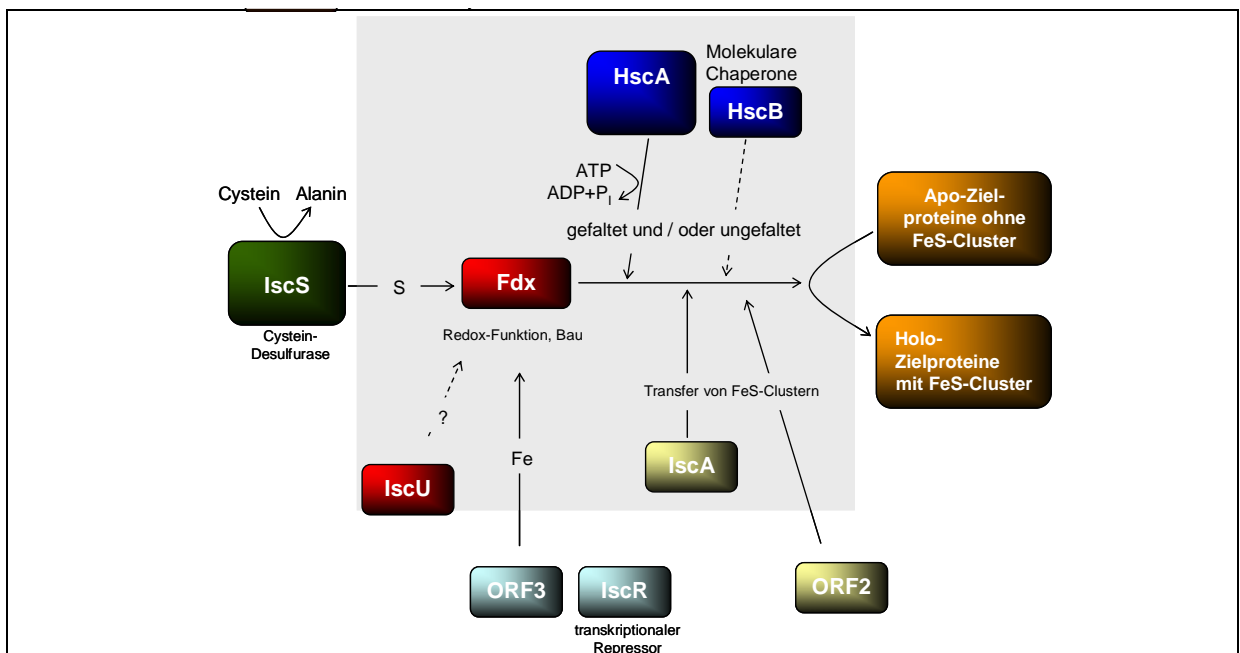


Abbildung 8: Modell der *isc*-Cluster-Funktionen (verändert nach Takahashi & Nakamura, 1999 und Tokumoto *et al.*, 2002).

Über die verschiedenen Proteine wird der aus dem Cystein gewonnene Schwefel auf das Zielprotein übertragen. Chaperone sind dabei für die Faltung wichtig, verschiedene Isc-Proteine helfen beim Transfer der FeS-Cluster.

IscS ist eine Cystein-Desulfurase, die den Abbau des Schwefels vom Cystein katalysiert. Der vom Enzym gebundene Schwefel wird an Fdx weitergeleitet. Fdx enthält ein stabiles [2Fe-2S]-Cluster und dient möglicherweise als Elektronendonator. IscU ist ein Dimer mit [2Fe-2S]- oder [4Fe-4S]-Cluster. IscA kann ebenso, wie die Chaperone HscA und HscB instabile FeS-Cluster zusammensetzen (Tokumoto *et al.*, 2002).

Dieser Abbau von S_8 zum Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern könnte als Modell für die Schwefelmobilisierung funktionieren (Abb.7C). So könnte ein extrazelluläres Protein ein Schwefel-Atom aus dem elementaren Schwefel (S_8) abspalten, ähnlich der Reaktion des IscS, die aus Cystein ein Schwefelatom abspaltet. Das nächste Enzym in der Kaskade wäre membrangebunden und wäre somit der Transporter. Seine Funktion wäre die Weitergabe des Schwefelatoms, ähnlich wie Fdx. Der Empfänger des Schwefels wäre die SOR, die ihn zur Oxidation verwendet, anders als im Fall des Isc-Clusters wo der Schwefel in das Zielprotein eingebaut wird.

Ein Eisentransport wäre im Fall der Schwefelmobilisierung unwahrscheinlich. Hier würde es sich anders als beim Isc-Cluster nur um einen Transport von Schwefel handeln. Um den Schwefel jedoch vom ersten Protein abzuspalten und einzubauen und in einer Kaskade weiterzugeben, müssten alle beteiligten Proteine, außer der SOR, FeS-Cluster besitzen.

In dieser Arbeit sollte die Mobilisierung des Schwefels analysiert werden. Durch Wachstumsversuche mit alternativen Schwefelverbindungen wie Tetrathionat und Thiosulfat sollte getestet werden, ob *Acidianus* mit einer dieser Verbindungen als extrazelluläre Zwischenverbindung wächst. Weiterhin sollte durch Suche nach extrazellulären Proteinen die enzymatische Umsetzung des Schwefels untersucht werden. Als Vergleich sollte hierbei der anaerobe Schwefelstoffwechsel herangezogen werden, bei dem eine Schwefelmobilisierung und ein Transport in die Zelle nach jetzigen Erkenntnissen nicht nötig ist, da das schwefel-umsetzende Enzym, die Schwefelreduktase, membrangebunden nach außen gerichtet sitzt.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Organismen und Plasmide

<i>Acidianus ambivalens</i> DSM 3772	DSMZ, Braunschweig
<i>Sulfurisphaera</i> sp. MC1	TU-Darmstadt
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P1 DSM 1616	DSMZ, Braunschweig
<i>E. coli</i> TB1	New England Biolabs, Frankfurt / M
<i>E. coli</i> TopF10'	Invitrogen, Groningen (NL)
<i>E. coli</i> BL21	Stratagene, Amsterdam
pMAL-p2X	New England Biolabs, Frankfurt / M
pMAL-c2X	New England Biolabs, Frankfurt / M
pTYB4	New England Biolabs, Frankfurt / M
pET28c	Novagen, Bad Soden
CodonPlus (CP)	Stratagene, Amsterdam
pBluescript II SK(+)	Stratagene, Amsterdam

1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Die nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), AppliChem/LS (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München). Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (Heidelberg), Roche (Mannheim) und New England Bioabs (Frankfurt / M) bezogen.

Agarose (Seakem)	FMC / Biocym, Hess.Oldendorf
Alcian Blau	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Biomax MR Röntgenfilme	Kodak, Rochester
Biodyne A Nylon-Transfermembranen	Pall Corporation
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DAP Goldstar DNA Polymerase	Eurogentec, Seraing
DIG DNA/DIG RNA Labelling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG-DNA-Labeling Kit	Roche, Mannheim
Dithiotreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard #SM0331	Fermentas, Heidelberg
DNA-Größenstandard #SM0241	Fermentas, Heidelberg
dNTP	Boehringer, Mannheim
Dodecylmaltosid (DM)	Gerbu, Gaiberg
ECL-Detektionskit	Amersham Pharmacia, UK
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg

Hefeextrakt	Difco/Nordwald, New York
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Kanamycin	Sigma, München
λ -Eco-Hind-Marker	Fermentas, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumtetrathionat	Riedel de Haën, Seelze
Neuraminidase	Roche, Mannheim
N-Lauroylsarcosine-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Octyl- β -D-glycopyranosid	Riedel-de-Haen, Hannover
O-Glycosidase	Roche, Mannheim
PAD-1 (Serdolit)	Serva, Heidelberg
Pfu-Polymerase	Fermentas, Heidelberg
PNGaseF	Roche, Mannheim
Protein-Massenstandard (14 – 116 kDa) (#SM0431)	Fermentas, Heidelberg
QIAGEN Plasmid Miniprep	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rinderserumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
RNaseA	Roth, Karlsruhe
RNA Größenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
SequiTherm EXCEL Long-Read Sequencing Kit-LC	BIOzym
Sesqui Term Excel DNA Polymerase	Epicentre / Biozym, Hess.-Oldendorf
Spectra/Por Biotech PVDF-Dialysemembran	Spectrum, Breda (NL)
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt / M
Taq-Polymerase	Fermentas, Heidelberg
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
2,4,6-Tripyridyl-s-Triazin (TPTZ)	Acros, Geel (Belgien)
Trypton	Difco / Nordwald, New York

1.3 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

TE-Puffer (Sambrook & Russel, 2001)

Tris / HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0

KPi-Puffer (Sambrook & Russel, 2001)

KH ₂ PO ₄	96 ml
K ₂ HPO ₄	4 ml
pH	8,0

Schwefel-Inkubationspuffer

EF.A-Puffer

KPi	0,1 M
Harnstoff	8 M
β -Mercaptoethanol	0,1 M
pH	8,5

EF.B-Puffer

KPi	0,1 M
Detergenz*	1,5%
β -Mercaptoethanol	0,1 M
pH	8,5

* Natriumdesoxycholat, TWEEN-20, Triton x-100, Octylglycosid oder Dodecylmaltosid

Wasch- und Lyse-Puffer

WL.A-Puffer (für *Acidianus*)

EDTA	2 mM
Natriumdesoxycholat	0,5%
KPi	100 mM
Glycerin	10%
pH	8,0

WL.B-Puffer (für *E. coli*)

EDTA	2 mM
TWEEN 20	1,5%
KPi	100 mM
Glycerin	10%
pH	8,0

CB-Puffer (NEB, Ffm)

EDTA	2 mM
TWEEN 20	1,5%
KPi	100 mM
Glycerin	10%
pH	8,0

PP-Puffer (NEB, Ffm)

EDTA	2 mM
Natriumdesoxycholat	0,5%
KPi	100 mM
Glycerin	10%
pH	8,0

1.4 Medien***Acidianus*-Medium (Teixeira *et al.*, 1995)**Acidianus-Grundmedium, pro Liter

7,5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	20 ml
140 g/l KH ₂ PO ₄	20 ml
12,5 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20 ml
3,5 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O	20 ml
1,4 g/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O	20 ml
Oligoelement-Stammlösung	2 ml
10% Hefeextrakt	4 ml
pH (mit 50% H ₂ SO ₄)	2,5

Oligoelement-Stammlösung, pro Liter

Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	4,51 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,8 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
VO ₂ SO ₄ x 5 H ₂ O	0,035 g
Na ₂ MoO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
pH (mit konz. H ₂ SO ₄)	1,0

alternative Zusätze zum Grundmedium

1% Schwefel	1%
Kaliumtetrathionat	10 mM
Natriumthiosulfat	10 mM

Kryostock-Medium

Acidianus-Medium	200 ml
60% Glycerin	100 ml
pH	5,0

Trypton-Brock-Medium (Brock *et al.*, 1972)100x Teilmedium, pro Liter

(NH ₄) ₂ SO ₄	130 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	25 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	2 g

1000x Teilmedium, pro Liter

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	70 g
--	------

200x Teilmedium, pro Liter

KH ₂ PO ₄	56 g
MnCl ₂	360 mg
ZnSO ₄	44 mg
CuCl ₂	10 mg
VO ₂ SO ₄	6 mg
Na ₂ MoO ₄	6 mg
Na ₂ B ₄ O ₇	0,9 mg
CoSO ₄	2 mg

Trypton-Brock-Medium, pro Liter

100 x Teilmedium	10 ml
200 x Teilmedium	5 ml
1000 x Teilmedium	1 ml
Trypton	0,2%
pH (mit 50% H ₂ SO ₄)	3,0 – 3,5

Medien für *E. coli* (Sambrook & Russel, 2001)

LB-Medium, pro Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
entsprechende Antibiotika	s. u.

LB-Agar, pro Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
entsprechende Antibiotika	s. u.
Bactoagar	15 g

SB-Medium, pro Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	2 g
entsprechende Antibiotika	s. u.

AXI-Agar

LB-Agar	500 ml
20 mg X-Gal/ml DMF	1 ml
100 mg/ml Ampicillin	500 µl
100 mM IPTG	200 µl

Endkonzentrationen der Antibiotika bei Expressionsmedien und Agarplatten

Ampicillin	100 µg / ml
Chloramphenicol	30 µg / ml
Kanamycin	25 µg / ml
Tetracyclin	10 µg / ml

1.5 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Unterstrichen = Mutationen zum Einfügen von Schnittstellen; **Grün** = eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme; *pll* = Sequenz mit langem Leader, *plm* = Sequenz mit mittlerem Leader, *plk* = Sequenz mit kurzem Leader, *pol* = Sequenz ohne Leader, *osc* = Sequenz mit deletiertem Stopcodon, *msc* = Sequenz mit Stopcodon.

Name	Oligonukleotid	Länge	Firma
zur Amplifizierung der <i>sbp</i> -Inserts zur Expression in <i>E. coli</i> (siehe 4.3.1 & 4.4.2)			
<i>sbp_1N_pll</i>	A TAA <u>GAA</u> <u>TTC</u> <u>ACC</u> <u>ATG</u> GAA TAC GAT AAC ACT TTC	34 nt	Biomers, Ulm
<i>sbp_2N_plm</i>	C AAC <u>GAA</u> <u>TTC</u> <u>ACC</u> <u>ATG</u> GAT CTC TCG ACC AAG	31 nt	
<i>sbp_3N_plk</i>	G TTA <u>GAA</u> <u>TTC</u> <u>GAC</u> <u>ATG</u> TTA GTT CCA ATG TTC	31 nt	
<i>sbp_4N_pol</i>	C CAA <u>GAA</u> <u>TTC</u> <u>TCC</u> <u>ATG</u> <u>GTA</u> ATC AAG GAG TAA TAT	34 nt	
<i>sbp_1C_msc</i>	A CTA <u>AAG</u> <u>CTT</u> <u>TTA</u> ATC CTG ATT ACT ATA G	29 nt	
<i>sbp_2C_osc</i>	AA <u>GTC</u> <u>TCG</u> <u>AGA</u> TCC TGA TTA CTA TAG	26 nt	
für die Kolonie-PCR (siehe 4.4.7)			
M13 universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	17 nt	MBI-Fermentas, Heidelberg
M13 reverse	GTT TTC CCA GTC ACG AC	17 nt	
für die Sequenz-PCR (siehe 4.5)			
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20 nt	MWG Biotech, Ebersberg
Cyb2	TGG TAA TAA GGT CAT GG	17 nt	
für die 16S-PCR (siehe 4.2.1)			
Archaea 20F	TTC CGG TTG ATC CYG CCG G	19 nt	MWG Biotech, Ebersberg
Archaea 958R	AAA TGG AGT CAA CGC CGG R	19 nt	
für die Primer-Extension (siehe 6.3)			
<i>sbp_primerext</i>	CAG GTA ATG TTA CAC CAC TAG CTT GA	26 nt	Biomers, Ulm

2 Wachstum und Fraktionierung

2.1 Anzucht und Ernte

2.1.1 *Acidianus*

Zur Proteinisolierung wurden die Kulturen im 15 l Maßstab (Fermenter), für die Analyse von Zwischenverbindungen im 50 ml Maßstab angezogen. Die Fermenter wurden dabei mit 250 ml Vorkultur, die 50 ml Kulturen mit 50 µl Kryokonserven direkt angeimpft. Alle anaeroben Kulturen wurden mit CO₂ und H₂ begast, die aeroben Fermenterkulturen mit CO₂-angereicherter Luft. Die aeroben 50 ml Kulturen wurden nicht begast. Alle Kulturen wurden in Ölbädern angezogen. Die Temperatur wurde dabei auf 80° C eingestellt, der pH-Wert im Medium zu Beginn auf 2,5 (siehe 1.4). Die Wachstumszeit bis zur Ernte betrug bei aeroben Kulturen 3 – 4 Tage, bei anaeroben Kulturen bis eine Woche.

Zum Ernten der 50 ml Kulturen wurde der gesamte Überstand (Kulturüberstand mit Zellen) filtriert, um den Schwefel zurückzuhalten. Aus dem erhaltenen schwefelfreien Überstand wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, GSA, 10 000 x g, 10 min) isoliert.

Zum Ernten des Fermenters wurden zunächst die Begasung und der Rührer abgeschaltet. Nach einer Stunde konnte der Überstand (Kulturüberstand mit Zellen) ohne den abgesetzten Schwefel abgepumpt werden. Aus dem abgepumpten schwefelfreien Überstand wurden die Zellen ebenfalls durch Zentrifugation (Sorvall, SLA3000, 8 000 x g, 10 min) isoliert. Die Kryokonserven wurden mit Zellen aus 50 ml Kultur hergestellt. Dazu wurde das Zellsediment in entsprechender Menge Kryostock-Medium (siehe 1.4) resuspendiert und bei –80° C gelagert.

2.1.2 *Sulfurisphaera* und *Sulfolobus*

Beide Kulturen wurden im 250 ml Maßstab für die Wachstumsanalyse angezogen. *Sulfolobus* wurde dabei im Trypton-Brock-Medium bei 80° C, *Sulfurisphaera* im *Acidianus*-Medium bei 93° C angezogen. Begast wurden beide Kulturen nicht.

2.2 Wachstumsanalyse

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde die Zellsuspension 1 min bei 1 000 x g zentrifugiert, um den Schwefel zu sedimentieren. Mit dem Überstand wurde dann die oD-Bestimmung bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Thomazählkammer im Phasenkontrastmikroskop. Die Zellzahl pro ml errechnete sich bei einem Großquadrat aus $\frac{1}{4}$ Volumen x 10⁷. Das heißt der Zelltiter entspricht gleich

den gezählten Zellen $\times (2,5 \times 10^6)$. Aus den Wachstumskurven wurde die Verdopplungszeit t_D bestimmt. Aus ihr wurde die spezifische Wachstumskonstante μ berechnet ($\mu = \ln 2 / t_D$).

2.3 Fraktionierung

Zur Proteinaufreinigung wurden die Fermenterkulturen verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet (siehe 2.1). Der im Fermenter abgesetzte Schwefel (siehe 2.1) wurde aus dem Fermenter ausgekratzt. Als extrazelluläre Fraktionen wurden der Kulturüberstand und das Schwefelsediment nach Kulturwachstum verwendet. Der Schwefel wurde dabei teils direkt verwendet, teils vorher mit *Acidianus*-Medium gewaschen, um Zellreste zu entfernen. Die dabei entstandene Schwefel-Waschfraktion wurde ebenfalls untersucht.

Als Vergleichsfraktionen dienten sowohl Membransolubilisat als auch cytoplasmatische Proteinfraction der Zellen. Dazu wurde das Zellsediment in 0,1 M KPi (pH 8) resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C sowie anschließender zweimaligen Ultraschallbehandlung lysiert. Die Trennung in Membran- und cytoplasmatische Proteinfraction erfolgte durch Ultrazentrifugation (SW 41, Beckmann, 27 000 rpm, 1 h, 4°C). Das Sediment wurde in 0,1 M KPi (pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 1% Natriumdesoxycholat erfolgte die Beschallung der Membranfraktion im Ultraschallwasserbad (20 min, Bandelin Sonorex super RK 103H). Nach einer erneuten Ultrazentrifugation (SW 41, Beckmann, 27 000 rpm, 1 h, 4°C) verblieben die solubilisierten Proteine im Überstand.

Der Kulturüberstand der 50 ml Kulturen wurde für die colorimetrischen Bestimmungen und die Dünnschichtchromatographie (DC) benötigt (siehe 7).

2.4 Wachstum von *Acidianus ambivalens* im Dialyseschlauch

Um Zellen getrennt vom Schwefel anzuziehen, wurden säure- und hitzeresistente Dialyseschläuche auf PVDF-Basis (Spectrum, Breda) verwendet. Die Zellen wurden in Schwefelfreiem Medium suspendiert. Der verschlossene Dialyseschlauch wurde in *Acidianus*-Medium mit 1% Schwefel gelegt und bei 80° C unter Schütteln inkubiert. Als Negativkontrollen diente Medium, als Positivkontrollen Kulturen, die normal im Kolben angezogen wurden. Zum Test, ob der Dialyseschlauch sich negativ auf das Wachstum der Kulturen auswirkt, wurden Kulturen mit einem Stück Dialyseschlauch im Kulturüberstand angezogen. Weiterhin wurde auch eine Mediumskontrolle mit einem Stück Dialyseschlauch im Medium inkubiert. Vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende wurde das Wachstum durch Bestimmung der Zellzahl überprüft. Zusätzlich wurden je 1 ml Kulturüberstand, bzw. Medium oder Zellsuspension zentrifugiert, in 10 µl resuspendiert und unter dem Phasenkontrast-Mikroskop auf das Vorhandensein von Zellen untersucht.

3 Proteine

3.1 Isolierung von Proteinen

3.1.1 Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand

Aus kleineren Mengen Kulturüberstand (bis 1 l) wurden die Proteine direkt durch Trichlor-essigsäure (TCA) gefällt (siehe 3.2.2). Bei größeren Mengen (ab 1 l) wurde zunächst der pH-Wert mit Na_2CO_3 auf 2,5 eingestellt und anschließend die Fraktion am Rotationsverdampfer auf 1/4 ihres vorherigen Volumens eingeeengt. Aus der eingeeengten Fraktion wurden anschließend die Proteine mit TCA gefällt. Nach Resuspendierung des Proteinsedimentes in EF.A-Puffer wurden die Fraktionen über Nanosep-10 (Pall) oder Centricon-3-Säulen (Amicon) durch Zentrifugation (Nanosep-10: 13000 x g, Eppendorf, Centricon-3: 7500 x g, SS34) auf 100 µl eingeeengt.

3.1.2 Proteinisolierung über Säulen

PAD-1-Säulen (Choi *et al.*, 1999, 2000; Brötz *et al.*, 1998)

PAD-1 (= Protein-Adsorbens, Serdolit) ist ein Ionenaustauschermaterial zur Isolierung von Proteinen. 10 l Medium wurden auf die mit H_2O und Puffer A (s.u.) äquilibrierte Säule gegeben. Je 1 Liter wurde dabei 10 min rührend mit dem Säulenmaterial inkubiert. Die Elution erfolgte mit Puffer A - Puffer B - Gemischen mit steigenden Isopropanol Endkonzentrationen (5% - 90%). Anschließend wurde die Säule mit ddH_2O und Puffer A gewaschen.

Puffer A

Methanol	50%
KPi	50 mM
pH	7,0

Puffer B

Isopropanol	90%
Trifluoressigsäure	0,2%
pH	2,2

Schwefel-Säulen

Als Säulenmaterial wurde Schwefel verwendet. Um die Säulenmaterialdichte etwas aufzulockern, wurde der Schwefel mit sterilen Glaskügelchen versetzt. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit je 250 ml Elutionspuffer und H_2O . Zur Proteinisolierung wurden 3 l Kulturüberstand verwendet. Die Elution erfolgte mit 250 ml Elutionspuffer.

Elutionspuffer

KPi	0,1 M
Harnstoff	8 M
β -Mercaptoethanol	0,5 M
pH	7,5

3.1.3 Proteinisolierung aus dem Schwefel

Dabei wurde Schwefelsediment nach Wachstum der Kulturen verwendet. Das filtrierte oder unbehandelte Schwefelsediment (≥ 30 g) wurde in 50 ml EF.A- oder EF.B-Puffer gegeben und zu einer homogenen Suspension gerührt. Die Entfaltung der Proteine aus dieser Suspension erfolgte für 1 Stunde bei 60° C (Wittung-Stafhede *et al.*, 2000). Durch Filtration wurde der Schwefel von der Proteinlösung getrennt. Als Negativkontrolle diente purer Schwefel ohne Inkubation mit Medium oder Kultur. Auch er wurde mit EF-Puffer versetzt und der oben beschriebenen Prozedur unterzogen. Als Vergleich wurden *Acidianus*-Zellen ebenfalls mit EF.B-Puffer mit Triton X-100 als Detergenz wie oben beschrieben behandelt. Hier wurde das Zellsediment jedoch anschließend durch Zentrifugation (5 min, 13 000 x g, Eppendorf) getrennt.

3.1.4 Isolierung von S-Layern (<http://molmic35.biol.rug.nl/extremophiles/labbook/protein/slayer.html>)

0,5 g Zellen wurden mit 500 µl Puffer A gemischt, 20 min bei 45° C inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (13 000 x g, Eppendorf). Das Sediment wurde in 500 µl 1 x Puffer A resuspendiert, erneut 20 min bei 45° C inkubiert und 10 min zentrifugiert (13 000 x g, Eppendorf). Das erhaltene Sediment besteht aus oberen weißen S-Layer und unterer brauner Membranfraktion. Der S-Layer wurde vorsichtig überführt und in 100 µl Puffer B resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei 45° C und 10 min Zentrifugation bei 13 000 x g (Eppendorf), wurde das Sediment in 100 µl H₂O resuspendiert.

3.2 Untersuchung von Proteinen

3.2.1 Proteingehaltsbestimmung

Proteingehaltsbestimmung nach der E₂₈₀-Methode (Gill & Hippel, 1989)

Eine optische Dichte von 1, bei einer Wellenlänge von 280 nm entspricht einem Proteingehalt von 0,5 bis 1,5 mg / ml, abhängig vom Gehalt an Tryptophan, Prolin und Tyrosin im Protein. Die Proteinnachweisgrenze liegt bei 2000 – 3000 µg Protein (Lottspeich & Zorbas, 1998a). Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E = \log (J_0 / J) = \varepsilon \times d \times c \Rightarrow c \text{ in mg / ml} = [E / (\varepsilon \times d)] \text{ (wobei } E = oD, \text{ weil } d = 1)$$

wobei: E = Extinktion, J = Intensität des austretenden Lichtstrahls, J₀ = Intensität des eintretenden Lichtstrahls, c = Proteingehalt in mg / ml, d = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung in cm = 1, ε = molarer Extinktions- oder Absorptionskoeffizient in M⁻¹cm⁻¹, oD = optische Dichte.

Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (Bradford , 1976)

Durch die Bindung des in der Bradford Reagenz enthaltenen Coomassie Brilliant Blue G-250 an positiv geladene Aminosäuren verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes durch Zunahme der Extinktion bei 595 nm, die ein Maß für den Proteingehalt ist. Zu 20 µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden 980 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die oD bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinnachweisgrenze bei diesem Test liegt bei etwa 1 µg Protein.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G 250	0,01% (w/v)
Ethanol abs	4,75% (v/v)
Phosphorsäure	8,5% (v/v)

Proteingehaltsbestimmung mit Mikrobiuret (Goa, 1976)

200 µl Proteinlösung wurden mit 200 µl 20%ige TCA-Lösung gemischt und anschließend für 5 min bei >12.000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 500 µl Biuret-Mischlösung gelöst und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde 500 µl Wasser zugesetzt.

Durch das in der Biuret-Mischlösung enthaltene Kupfersulfat bildet sich in der alkalischen Lösung ein Cu^{2+} -Protein-Komplex. Dabei wird das Cu^{2+} an den Peptidbindungen und Tyrosin-Seitenketten zu Cu^+ reduziert. Durch diese Biuret-Reaktion kommt es zu einem blauen Farbumschlag, der photometrisch bei $\lambda = 330 \text{ nm}$ gemessen werden kann.

Lösung A

Natriumcitrat	17,3 g
Na_2CO_3	10,0 g
H_2O	80 ml
unter Erwärmen lösen, noch warm filtrieren	

Lösung B

CuSO_4	1,73 g
H_2O	10 ml
unter Erwärmen lösen	

Benedict-Reagenz

Lösung A	80 ml
Lösung B	10 ml
H_2O	ad 100 ml

Biuret-Mischlösung

0,75 N NaOH	4 ml
Benedict-Reagenz	0,2 ml

3.2.2 Fällung von Proteinen (Eckert & Kartenbeck, 1997)

Trichloressigsäure- Fällung (Porath *et al.*, 1960)

Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 2:1 mit 20%iger Trichloressigsäure versetzt und 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert (Eppendorf). Nach Dekantierung des Überstands wurde das

Sediment in der SpeedVac getrocknet und anschließend in geeignetem Puffer resuspendiert.

HCl-Fällung

Dazu wurden 2 Volumen Proteinlösung mit 1 Volumen 8 M Salzsäure gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert (Eppendorf). Das Sediment wurde in der SpeedVac getrocknet und in geeignetem Puffer resuspendiert.

Aceton-Fällung (Scopes, 1994)

Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit –20° C kaltem Aceton versetzt, gemischt und 10 min bis 3 h bei –20° C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation (10 000 x g, 5 min, 4°C, Eppendorf) sedimentiert, das Sediment in der SpeedVac getrocknet und in geeignetem Puffer resuspendiert.

Ethanol-Fällung (Scopes, 1994)

Die Proteinlösung wurde mit 5 Vol –20° C kaltem Ethanol (p.A.) versetzt und gemixt. Nach 10 min Inkubation bei –20° C wurde 5 min bei 4° C zentrifugiert (10 000 x g, Eppendorf), das Sediment in der SpeedVac getrocknet und anschließend in geeignetem Puffer resuspendiert.

Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel & Flügge, 1984)

Die Proteinlösung wurde mit 4 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform gemischt und anschließend gemixt. Nach Zugabe von 3 Volumen ddH₂O (bezogen auf die ursprüngliche Proteinlösung) wurde der Ansatz für 1 min gemixt, 5 min bei 5 000 – 8 000 x g zentrifugiert (Eppendorf) und anschließend die wässrige Phase verworfen. Das Protein befand sich nun in der Interphase. Zu der Interphase und der unteren Phase wurden 3 Volumen Methanol zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 13 000 x g, Eppendorf) wurde der Überstand verworfen, das Sediment in der SpeedVac getrocknet und in geeignetem Puffer resuspendiert.

3.2.3 Glykosylierung

Nachweis einer Glykosylierung (Wardi & Michos, 1972)

Die Proteine wurden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.3.1). Das ungefärbte Gel wurde dann in verschiedenen Lösungen geschwenkt (30 – 60 min in 12,5% TCA; 50 min in Waschlösung und 30 min in 0,5% Kaliumdisulfit). Zwischen jedem der Arbeitsschritte wurde das Gel 5 min in ddH₂O geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Färbelösung mindestens 4 – 12 h gefärbt. Nach Entfärbung des Gels in 10% Essigsäure, sollten glykosylierte Proteine blau gefärbt, nicht-glykosylierte ungefärbt sein. Der Vergleich der glykosylierten Banden mit den insgesamt vorhandenen Banden erfolgte durch anschließende Färbung des Gels mit Coomassie.

<u>Waschlösung</u>		<u>Färbelösung</u>	
Perjodsäure	1 %	Alcian Blue	0,5%
Essigsäure	3%	Essigsäure	3%

Enzymatische Deglykosylierung (Slangen & Visser, 1999; Rademaker & Thomas-Oates, 1996)

0,33 mg Protein wurden in 200 µl Ammoniumbicarbonat (50 mM; pH 8,4) aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Toluol und 1U Enzym (PNGaseF, Neuraminidase und / oder O-Glycosidase; Roche, Mannheim) wurde der Ansatz für 16 h bei 37° C inkubiert.

3.2.4 Nachweis von Eisen-Schwefel-Zentren

Eisengehaltsbestimmung (Fischer & Price, 1964):

800 µl Proteinlösung wurden mit 100 µl HCl (8 M) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl TCA (80%), wurde das Gemisch 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 250 µl Ammoniumacetat (75%), 100 µl Hydroxylamin-Hydrochlorid (10%; NH₂OH x HCl) und 100 µl 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazin (4 mM) versetzt und jeweils gemischt. Die Bestimmung des Eisengehalts erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 593 nm mit Hilfe einer Ammoniumeisen [II]-Sulfat-Eichreihe (Fe[NH₄]₂[SO₄]₂).

Sulfidgehaltsbestimmung (King & Morris, 1967)

100 µl Zinkacetat (2,6%), 20 µl NaOH (5%), 140 µl Proteinlösung, 50 µl N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (0,1% in 5 M HCl) und 20 µl Eisenchlorid (11,5 M) wurden zusammengegeben und für eine Minute gemischt. Nach 30 min Inkubation bei RT, wurde der Ansatz mit 170 µl Wasser gemischt und anschließend zentrifugiert (13000 x g, 10 min).

Die Messung des Sulfidgehaltes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 670 nm mit Hilfe einer Dinatriumsulfid-Eichgerade.

3.2.5 Identifizierung von Proteinen

N-terminale Sequenzierung von Proteinen (Edmann & Begg, 1967)

Die N-terminale Sequenzierungen wurden von Prof. Lottspeich, Martinsried und Prof. Linder, Biochemisches Institut Gießen durchgeführt.

MALDI-TOF-Analysen (Chapman, 1996)

Die MALDI-TOF-Analysen wurden von ESPLORA, Darmstadt und AG Dencher, TU Darmstadt durchgeführt.

Untersuchungen am Protein

Die Suche der ermittelten SBP-Sequenz im *Acidianus*-Genom erfolgte mit der internen Datenbank des *Acidianus*-Genoms (Conrad, 2003). Die verschiedenen Analysen des Proteins erfolgten mit Programmen Psi-Pred, Inter-Pro-Scan (EMBL-EBI) und GCG Peptide Sort (Accelrys). Weiterhin wurde die Proteinsequenz mit den Programmen PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997; Gasteiger *et al.*, 2005) und FindPept (Gattiker *et al.*, 2002; Gasteiger *et al.*, 2005), GlycoMod (Cooper, *et al.*, 2001, 2003) untersucht, die im Internet unter der Adresse <http://www.Expasy.org> zur Verfügung standen.

3.3 Gele, Blots und Färbungen

3.3.1 SDS-PAGE (Schägger & von Jagow, 1987)

16% Trenngel

30% (Bis-) Acrylamid	26,6 ml
3 x Gelpuffer	16,6 ml
100% Glycerin	5,4 ml
ddH ₂ O	1,4 ml
TEMED	16,3 µl
10% APS	162,5 µl

Anodenpuffer

Tris / HCl	0,2 M
pH	8,9

Sammelgel

10% (Bis-) Acrylamid	3,9 ml
3 x Gelpuffer	7,5 ml
ddH ₂ O	19,5 ml
TEMED	24 µl
10% APS	240 µl

Kathodenpuffer

Tris / HCl	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1%
pH	8,45

3 x Gelpuffer

Tris / HCl	3 M
SDS	0,3%
pH	8,45

Kolloidales Coomassie (Roth)

Roti-Blue	20 ml
ddH ₂ O	60 ml
Methanol	20 ml

Als Massenstandard diente #SM0431 (Fermentas), als Probenauftragspuffer wurde Roti-Load 1 (Roth, Karlsruhe) verwendet. Er wurde entgegen den Angaben des Herstellers trotzdem mit den Proteinproben vor dem Gellauf für 5 – 10 min aufgekocht. Das beschickte Gel wurde mit einer Spannung von 50 – 120 V laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel mit kolloidalem Coomassie (Roti-Blue) oder Nicht-kolloidalem Coomassie (siehe 3.3.2) auf dem Schüttler über Nacht angefärbt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Wasser oder 10% Essigsäure entfärbt.

Teilweise wurde das Sammelgel komplett weggelassen und durch Trenngel ersetzt (wie bei Ahn *et al.*, 2001). Die SDS-PAGE wurde dennoch wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3.2 Semi-dry-blot (Kyhse-Andersen, 1984)Anodenpuffer

Tris / HCl	0,3 M
Tricin	0,1 M
pH	8,75

Kathodenpuffer

ϵ -Aminocapronsäure	0,3 M
Tris / HCl	30 mM
pH	8,65

Coomassie Nicht Kollodial

Methanol	25%
Essigsäure	10%
Serva Blue R	0,02%

Entfärbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%

Das Gel wurde für 3 h bei 200 mA mit dem horizontalen Graphitplattensystem Multiphor Novablot (Amersham, Pharmacia, Biotech) auf PVDF-Membranen (Gültekin & Heermann, 1988; Mozdznowski *et al.*, 1992; Pluskal *et al.*, 1986) geblottet. Für Sequenzierungen oder MALDI-TOF-Analysen wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und dann geblottet. Die PVDF-Membran wurde anschließend nicht mehr gefärbt. Für Western-Blots wurden ungefärbte Gele und Membranen verwendet.

3.3.3 Western-Blot (Burnette, 1981)

Zu untersuchende Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran übertragen (siehe 3.3.1 & 3.3.2), und der Transfer durch Anfärben der Proteine mit Ponceau-Rot kontrolliert. Die Blockierung erfolgte über Nacht in Blockierungspuffer. Nach

Waschen der Membran (je 10 min in 1xPBS und Puffer 1) wurde sie 1 h mit dem Erstantikörper inkubiert. Für pET-28c-Konstrukte wurde dazu Penta-His-Antikörper (Biorad) aus der Maus, für pMAL-p2X- und pMAL-c2X-Konstrukte Anti-MBP-Antikörper (NEB) aus dem Kaninchen verwendet. Nach Waschen der Membran (2 x 10 min in Puffer 1) erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1 h). Dazu wurde Anti-Maus-AK (Biorad) gegen den Penta-His-AK und Anti-Kaninchen-AK (Amersham) gegen den Anti-MBP-AK verwendet. Nach Waschen der Membran (3 x 10 min in Puffer 4) erfolgte die Inkubation mit dem Chemolumineszenzsubstrat (1 min; ECL, Amersham) und eine 3 – 5 min Aktivierung mit dem Röntgenfilm. Die Exponierung des Röntgenfilms erfolgte in verschiedenen Zeitabständen (2 – 10 min).

Ponceau-Rot

Ponceau-Rot S	0,29%
TCA	3%
Sulfosalicylsäure	3%

Blockierungspuffer

Magermilchpulver	2%
TWEEN 20	0,05%
1 x PBS	50 ml

Puffer 1

BSA	3%
TWEEN 20	0,05%
1 x PBS	150 ml

Puffer 3

Magermilchpulver	10%
TWEEN 20	0,05%
1 x PBS	20 ml

Puffer 2

BSA	3%
1 x PBS	20 ml

Puffer 4

TWEEN 20	0,05%
1 x PBS	20 ml

Erstantikörper

Penta-His-AK	1:1 000 in Puffer 2
Anti-MBP-AK	1:10 000 in Puffer 2

Zweitantikörper

Anti-Maus	1:3 000 in Puffer 3
Anti-Kaninchen	1:5 000 in Puffer 3

Fixierungslösung

Fixierer (Kodak, Nr. 1901875)	100 ml
H ₂ O	140 ml

Entwickler

Entwickler (Kodak, Nr.1900943)	200 ml
H ₂ O	700 ml

Stopplösung

Essigsäure	2%
------------	----

10 x PBS

NaCl	20 ml
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM
pH	7,4

3.3.4 Silberfärbung (Laska, 2000)

Das Polyacrylamidgel kann ungefärbt oder mit Coomassie gefärbt verwendet werden. Es wird zunächst 30 – 60 min in Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wird es 4 – 5 Stunden oder über Nacht in Inkubationslösung taumeln gelassen. Nach 3 x 5 min Waschen in H₂O, wird das Gel für 40 min in Silberlösung geschwenkt. Nach maximal 15 min in der Entwicklerlösung wird die Stopplösung zugegeben.

Fixierlösung

Ethanol	30%
Essigsäure	10%

Stopplösung

Na-EDTA x 2 H ₂ O	14,6 g
ddH ₂ O	ad 1l

Silberlösung

AgNO ₃	0,5 g
Formaldehyd	100 µl
ddH ₂ O	ad 0,5 l

Entwickler

Na ₂ CO ₃	12,5 g
Formaldehyd	50 µl
ddH ₂ O	ad 0,5 l

Inkubationslösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	1 g
Na-Acetat	20,6 g
Glutaraldehyd	2,6 ml
Ethanol	150 ml
ddH ₂ O	ad 0,5 l

3.4 Funktionstest

SBP-Proteinlösung wurde gegen Harnstoff und Detergenzienfreien Puffer dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde mit 80 g Schwefel bei 60° C 1 h inkubiert. Danach wurden Schwefel und Überstand durch Filtration getrennt und der Schwefel in EF.A-Puffer erneut 1 h bei 60° C inkubiert. Schwefel und Überstand wurden erneut durch Filtration getrennt und der Überstand durch SDS-PAGE auf das Vorhandensein von Proteinen untersucht.

Weiterhin wurde eine cytoplasmatische Proteinfraction aus *E. coli* verwendet. Sie wurde ohne Dialyse mit dem Schwefel inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden, wie oben beschrieben durchgeführt.

4 DNA

4.1 DNA-Analysen

4.1.1 Konzentrationsbestimmung (Sambrook & Russel, 2001)

Die Konzentration von DNA wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte bei 260 nm von 1 gleich 50 µg / ml dsDNA, bzw. 40 µg / ml ssDNA (Lottspeich & Zorbas, 1998b).

4.1.2 Agarose-Gele (Sambrock & Russel, 2001)

Die Auftrennung von DNA erfolgte elektrophoretisch mit 1 – 4% Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer. Die Färbung erfolgte mittels Ethidiumbromid, die Detektion unter UV-Licht bei 254 bzw. 312 nm. Als Marker dienten #SM0331, #SM0241 und λ -Eco-Hind (Fermentas).

6 x Proben-Auftragspuffer

Glycerin	30%
Bromphenolblau	0,25%
Xylencylamol	0,25%
EDTA	50 mM
pH	8,0

50 x Tris-Acetat (TAE)-Puffer

Tris base	242 g / l
0,5 M EDTA	100 ml / l
Eisessig	57,1 ml / l
pH	8,0

4.1.3 Aufreinigung von DNA

Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Acidianus ambivalens* wurde der DNeasy Tissue Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers oder die CTAB-Methode (Wilson, 1990) verwendet. Bei der CTAB-Methode wurden Zellen einer 50 ml Kultur in 567 μ l TE-Puffer resuspendiert und mit 30 μ l 10% SDS und 3 μ l 20 mg/ml Proteinase K gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 37° C wurden 100 μ l 5 M NaCl und 80 μ l CTAB/NaCl zugefügt, der Ansatz gemischt und 10 min bei 65° C inkubiert. Die DNA wurde durch eine anschließende Chloroform-Phenol-Extraktion gereinigt.

Chloroform-Phenol-Extraktion (Sambrook & Russel, 2001)

Die DNA-Lösung (PCR-Amplifikate, Plasmidisolierungen, genomische oder restringierte DNA etc.) wurde auf 200 μ l mit TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Chloroform / Phenol / Isoamylalkohol (24:1:25), wurde der Ansatz gemixt und 2 min bei 13.000 x g (Eppendorf) zentrifugiert.

Die obere Phase wurde mit $\frac{1}{10}$ μ l Natriumacetat des Gesamtvolumens sowie dem gleichem Volumen wie die obere Phase an Isopropanol versetzt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Zimmertemperatur (RT) inkubiert und bei 15.000 x g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Trocknung wurde das Sediment in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

PCR-Clean-up-Kit

Die Aufreinigung von DNA mit dem PCR-clean up Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers (Sigma, Hilden).

Gelextraktion über Säulchen

Die Aufreinigung von elektrophoretisch getrennten DNA-Banden aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

Freeze & Squeeze (Thuring *et al.*, 1975; Mülhard, 2003)

Die Banden von elektrophoretisch aufgetrennter DNA wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die zerkleinerten Gelstücke mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol überschichtet und kurz in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach 10 min Zentrifugation (13 000 x g, Eppendorf), wurde die obere Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform / Phenol versetzt und eine Chloroform-Phenol-Extraktion durchgeführt (s.o.).

4.2 Nachweis zur Kulturreinheit

4.2.1 16S-PCR

16S-PCR-Ansatz

10 x PCR-Puffer	2 µl	ddH ₂ O	ad20 µl
Taq/Pfu-Polymerase	0,2 µl	25 mM dNTP	0,2 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl	Primer (Archaea 20F/958R)	je 0,5 µl
DNA	1 µl		

Tabelle 4: 16S-PCR-Bedingungen am Robo Cycler (Programm 88)

Zyklus	Denaturierungsphase		Hybridisierungsphase		Verlängerungsphase	
	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]
1	5.00	94	1.30	54	2.00	72
2-34	0.45	94	1.30	54	2.00	72
35	0.45	94	1.30	54	10.00	72

4.2.2 ARDRA (Vaneechoutte *et al.*, 1992)

ARDRA steht für amplified ribosomal DNA restriction analysis. Es dient zum Nachweis der Kulturreinheit. Die 16S rDNA-Amplifikationsprodukte wurden mit *Tru I* geschnitten. Die mit Archaea 20F/958R geschnittenen PCR-Produkte sollten für *Acidianus* (527, 310, 66, 35 bp) und *Sulfurisphaera* (373, 269, 190, 66, 41) völlig unterschiedliche Banden ergeben.

Ansatz:

PCR-Amplifikat	8 µl
<i>Tru I</i>	3 U
Puffer	2,0 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

4.3 Hergestellte Konstrukte

4.3.1 Insert-DNA

Untersucht wurde die Gensequenz des Schwefel-Bindeproteins ohne (*sbp-pol*) und mit verschiedenen langen Leadersequenzen, ausgehend vom ersten (*sbp-pll*), zweiten (*sbp-plm*) und dritten ATG (*sbp-plk*) vor dem (durch N-terminale Sequenzierung bestimmten) Genstart (Abb. 9). Das Gen der entsprechenden Länge wurde mit verschiedenen Oligonukleotiden durch PCR amplifiziert und mit spezifischen Restriktionsendonukleasen für die Klonierung in unterschiedliche Expressions-Vektoren restringiert (Tab.5).

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide, Restriktionsenzyme und Vektoren. Farben siehe Abb.9

Insert	Konstrukt-name	Oligonukleotide für die PCR		für die Klonierung	
		N-term.	C-term.	Restriktionsenzyme	Vektor
<i>pll</i>	pL	<i>sbp_1N_pll</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-p2X
	cL	<i>sbp_1N_pll</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-c2X
	tL	<i>sbp_1N_pll</i>	<i>sbp_2C_osc</i>	<i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I	pTYB4
<i>plm</i>	pM	<i>sbp_2N_plm</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-p2X
	cM	<i>sbp_2N_plm</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-c2X
	tM	<i>sbp_2N_plm</i>	<i>sbp_2C_osc</i>	<i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I	pTYB4
<i>plk</i>	pK	<i>sbp_3N_plk</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-p2X
	cK	<i>sbp_3N_plk</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-c2X
	tK	<i>sbp_3N_plk</i>	<i>sbp_2C_osc</i>	<i>Pci</i> I / <i>Xho</i> I	pTYB4
<i>pol</i>	pO	<i>sbp_4N'2_pol</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-p2X
	cO	<i>sbp_4N'2_pol</i>	<i>sbp_1C_msc</i>	<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	pMAL-c2X
	eO	<i>sbp_4N'2_pol</i>	<i>sbp_2C_osc</i>	<i>BspH</i> I / <i>Xho</i> I	pET28c

<p><i>EcoR</i> I <i>Nco</i> I <i>sbp_2N_plm</i> CAACGAATTCCACCATGGATCTCTCGACCAAG</p> <p>CATAAGAATTCACCATGGAATACGATAACACTTTC <i>sbp_1N_pll</i></p> <p>TCATAAGTTTTTAATATCGAATACGATAACACTTTCAACAGATCTAGTATGGATCTCTCGACCAAGAAGGTAATAAGTGC</p> <p>... AGTATTCAAAAATTATACCTTATGCTATTGTGAAAGTTGTCTAGATCATACCTAGAGAGCTGGTTCTTCATTATTACGA</p> <p>... S * V F N M E Y D N T F N R S S M D L S T K K V I S A -</p> <p><i>sbp_3N_plk</i> <i>EcoR</i> I <i>BspH</i> I <i>sbp_4N'2_pol</i></p> <p><i>EcoR</i> I <i>Pci</i> I CCAAGAATTCCTTCATGAGTAATCAAGGAGTAATAT</p> <p>GTTAGAATTCGACATGTTAGTTCCAATGTTC</p> <p>GGTCTAGTTTTTATATACGCGTTAAGTTTGGCAATGTTAGTTCCAATGTTCCTTAGCAAGTAATCAAGGAGTAATATCTGCA</p> <p>CCAGATCAAAAATATATGCGCAATTCAAACCGTTACAATCAAGGTTACAAGAATCGTTCAATTAGTTCCTCATTATAGACGT</p> <p>G L V F I Y A L S L A M L V P M F L A S N Q G V I S A ...</p> <p>CCAGTAATAATTCCGCCAGCAATATGTATACAATATAAGACATTCTATAGTAATCAGGATTAATCACTTAGTTCGGACCG</p> <p>... GGTCAATTATTAAGGCGGTCTTATACATATGTTATATTCTGTAAGATATCATTAGTCCTAATTTAGTGAATCACGCCTGGC</p> <p><i>sbp_1C_msc</i> GATATCATTAGTCCTAATTTTCGAAATCA</p> <p><i>sbp_2C_osc</i> GATATCATTAGTCCTAGAGCTCTGAA</p> <p>XhoI HindIII</p> <p>C-terminus SBP< * I T * C G P</p>	
---	--

Abbildung 9: Übersicht über die hergestellten Konstrukte.

rot = *sbp_1N-pll* für das Konstrukt ausgehend vom ersten ATG (*pll*), blau = *sbp_2N-plm* für das Konstrukt ausgehend vom zweiten ATG (*plm*), hellblau = *sbp_3N-plk* für das Konstrukt ausgehend vom dritten ATG (*plk*), braun = *sbp_4N'2-pol* für das Konstrukt ausgehend vom durch N-terminale Sequenzierung bestimmten Proteinstart (*pol*), grün = C-terminaler Primer *sbp_1C-mcs* mit Stop-Codon, hellgrün = C-terminaler Primer *sbp_2C-osc* ohne Stop-Codon, orange = Start- bzw. Stop-Codon.

4.3.2 pMAL-c2X und pMAL-p2X

Der Expressionsvektor pMAL besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen und vor der Insertregion einen P_{tac} -Promotor. Es wurden zwei verschiedene Vektoren dieses Typs (pMAL-p2X und pMAL-c2X) verwendet. Beide Vektoren besitzen vor der mcs (Abb.11) das Gen des Maltose-Binde-Proteins (*mal E*, Abb.10). Dadurch entsteht bei der Expression durch Induktion mit IPTG ein Fusionsprotein aus Zielprotein und dem Maltose-Binde-Protein (MBP). Durch das MBP soll lösliches Zielprotein produziert werden und die Bildung von *inclusion bodies* vermieden werden (Maina *et al.*, 1988). Während der pMAL-p2X-Vektor vor dem MBP noch eine Signalsequenz enthält, die zum Transport des Fusionsproteins ins Periplasma führt, verbleibt das Zielprotein beim pMAL-c2X-Vektor im Cytoplasma. Die jeweiligen Inserts wurden über die Schnittstellen *EcoR* I und *Hind* III eingefügt (Abb.11).

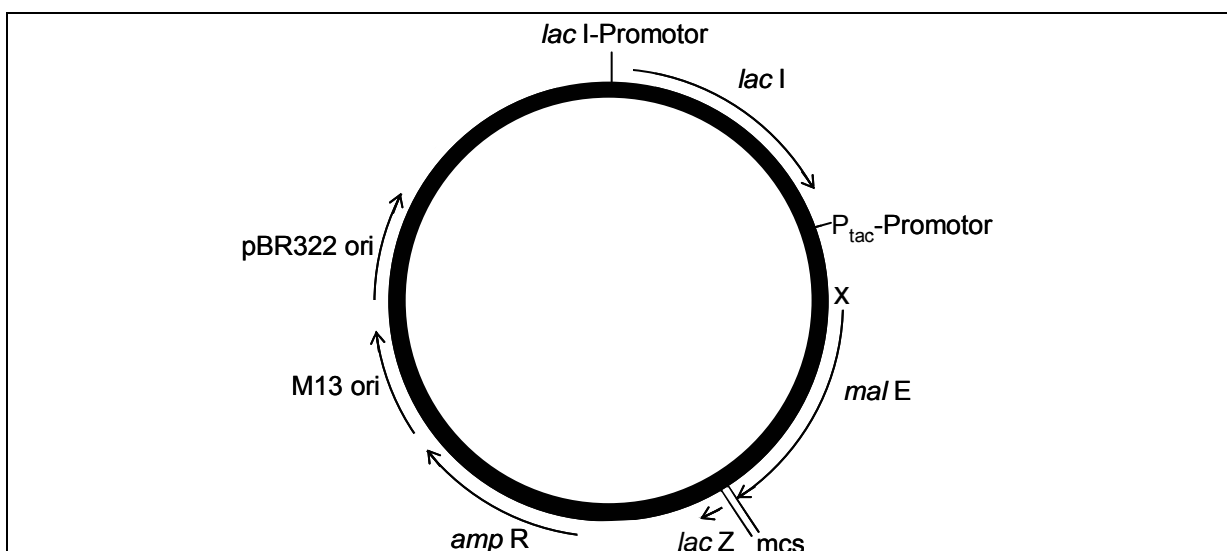


Abbildung 10: Vektorkarte der pMAL-Vektoren (pMAL-p2X und pMAL-c2X).

amp R = Ampicillin-Resistenz, *lac I* = *lac I*-Gen zur Produktion des Lac-Repressors, P_{tac} -Promotor = Initiator der Transkription, mcs = multiple cloning site, *mal E* = Gen des Maltose-Binde-Proteins, *lac Z* = β -Galactosidase-Gen, ori = origin of replication, x = hier liegt beim pMAL-p2X-Vektor eine *leader*-Sequenz fürs MBP-Protein (Mal E).

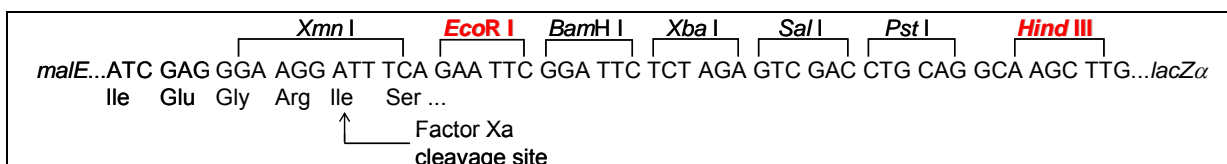


Abbildung 11: Multiple cloning site der pMAL-Vektoren (pMAL-p2X und pMAL-c2X).

mal E = Gen des Maltose-Binde-Proteins, *lac Z* = β -Galactosidase-Gen, Factor Xa cleavage site = Spaltsequenz zur Trennung des Insertproteins vom Maltose-Binde-Protein, Rot = verwendete Restriktionsschnittstellen.

4.3.3 pET28c

Beim Expressionsvektor pET28c kann man je einen C- und N-terminal von der mcs gelegenen His-Tag benutzen. Durch Insertion der Ziel-DNA kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, so dass aus dem C-terminal dargestellten Thr-Tag (Abb.13) ein His-Tag entsteht. Für die Expression des *sbp* wurde der C-terminal gelegene His-Tag verwendet. Aus diesem Grund wurde für die PCR ein C-terminaler Primer mit deletiertem Stop-Codon benutzt (*sbp_2C-osc*; siehe Tab.5). Der pET-Vektor besitzt eine Kanamycin-Resistenz (Abb. 12) und produziert durch Induktion mit IPTG cytoplasmatisches Ziel-Protein. Die jeweiligen Inserts wurden über die Schnittstellen *Nco* I und *Xho* I eingefügt (Abb.13).

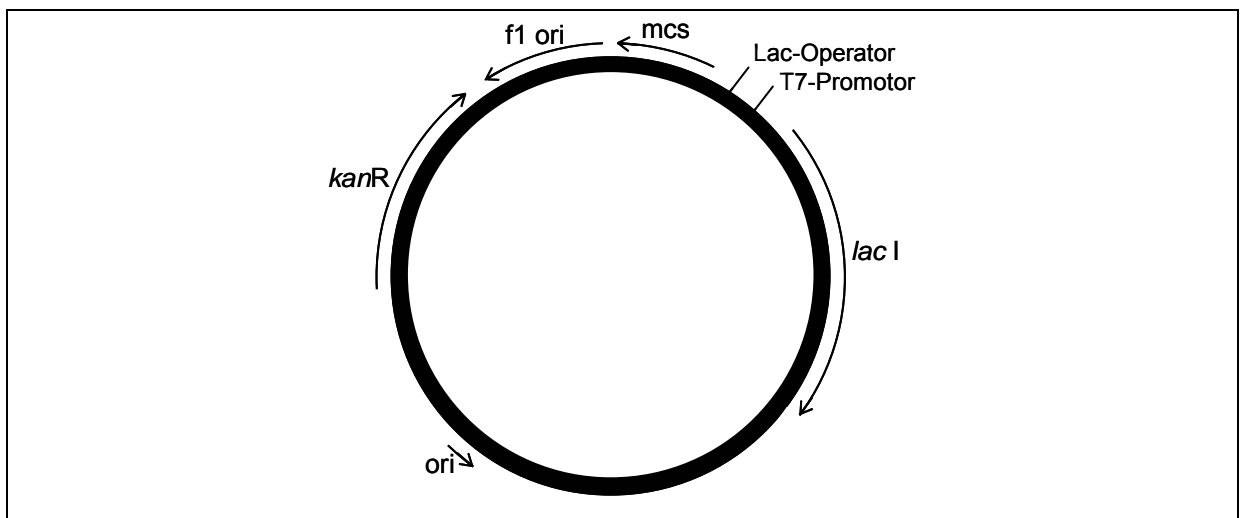


Abbildung 12: Vektorkarte des pET28c-Vektors.

kann R = Kanamycin-Resistenzkassette, f1 ori = origin of replication für Helfer-Phagen, mcs = multiple cloning site, Lac-Operator = Bindestelle des Lac-Repressors, T7-Promotor = Initiator der Transkription, *lac I* = *lac I*-Gen zur Produktion des Lac-Repressors, ori = origin of replication.

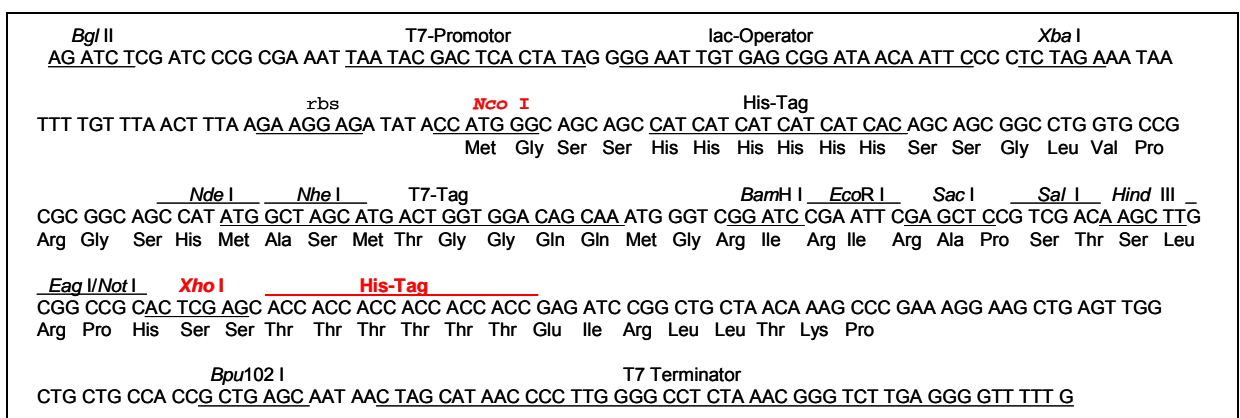


Abbildung 13: Multiple cloning site des pET28c-Vektors.

T7-Promotor = Initiator der Transkription, Lac-Operator = Bindestelle des Lac-Repressors, His-Tag = N-terminal (schwarz) und C-terminal (rot), T7-Terminator = Stop der Transkription, Rot = verwendete Restriktionsschnittstellen, bzw. verwendeter His-Tag.

4.3.4 pTYB4

Der Expressionsvektor pTYB4 stellt Fusionsprotein bestehend aus Zielprotein und Intein mit Chitin-Binde-Domäne her (CBD; Abb.14). Während das Intein als Schnittstelle zwischen dem Zielprotein (SBP) und der CBD dient, ist das CBD zur Aufreinigung des hergestellten Fusionsproteins (SBP-CBD) gedacht. Für die PCR wurde ein C-terminaler Primer ohne Stop-Codon (*sbp_2C_osc*; Tab.5) benutzt, da Intein und CBP hinter der mcs liegen. Durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) kann die Transkription und somit eine kontrollierte Fusionsprotein-Produktion stattfinden. Die jeweiligen Inserts wurden über die Schnittstellen *Nco* I und *Xho* I eingefügt (Abb.15).

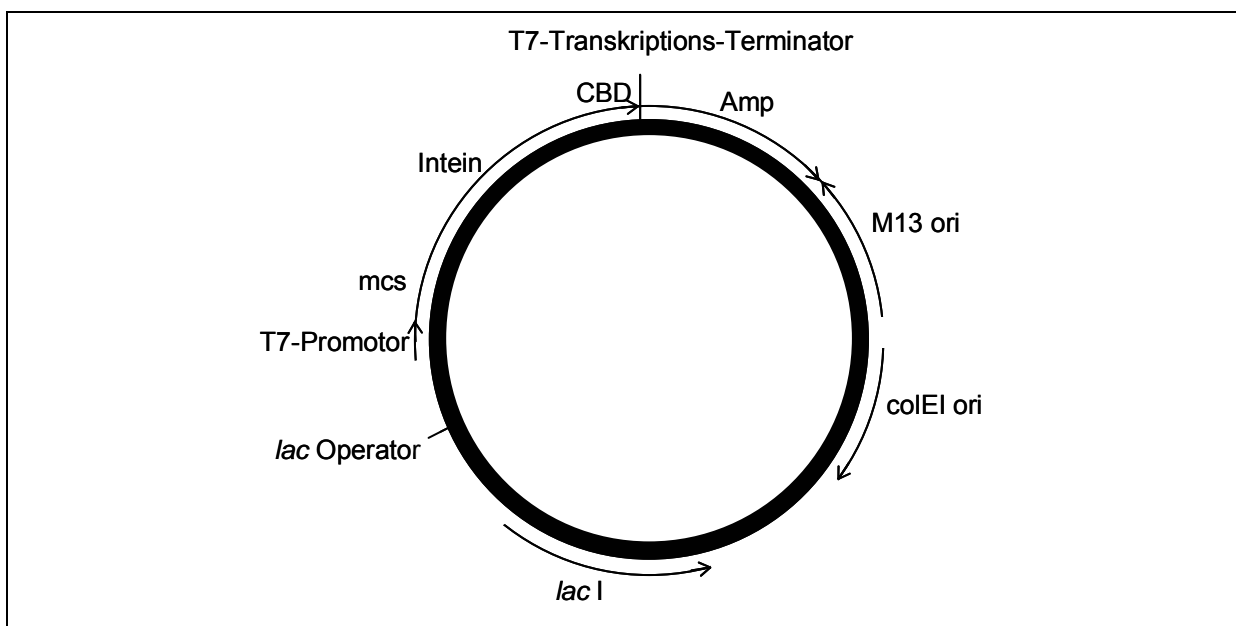


Abbildung 14: Vektorkarte des pTYB4-Vektors (7719 bp).

amp R = Ampicillin-Resistenzkassette, *lac* I = *lac* I-Gen zur Produktion des Lac-Repressors, Lac-Operator = Bindestelle des Lac-Repressors, T7-Promotor = Initiator der Transkription, MCS = multiple cloning site, Intein = Inteinsequenz, CBD = Chitin-Binde-Domäne, T7-Transkriptions-Terminator = Stop der Transkription, ori = origin of replication.

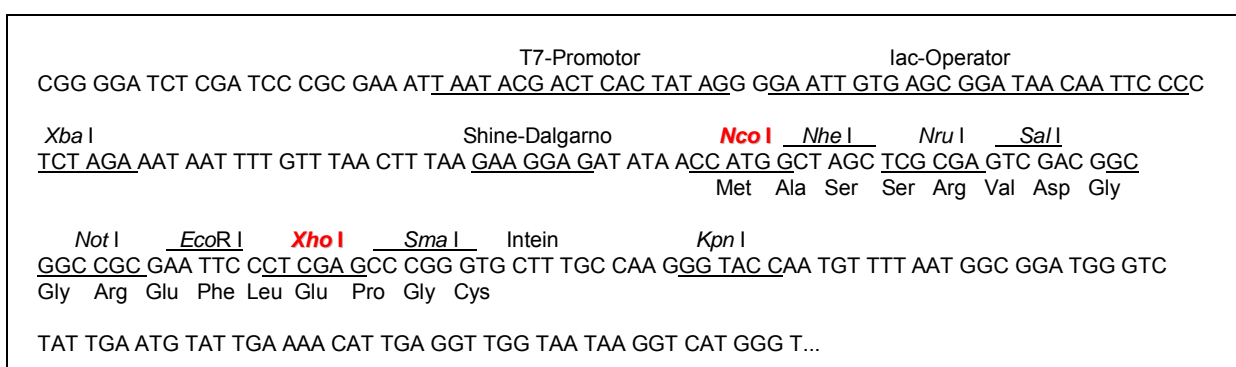


Abbildung 15: Multiple cloning site des pTYB4-Vektors.

Lac-Operator = Bindestelle des Lac-Repressors, T7-Promotor = Initiator der Transkription, Rot = verwendete Restriktionsschnittstellen.

4.3.5 Größen der Konstrukte und Vektoren

Konstrukt	Größe in bp		Masse in kDa	
	Vektor + <i>sbp</i>	nur <i>sbp</i>	Fusionsprotein	nur SBP
pMAL-p2X-PLL	7758	1067	84,39	39,91
pMAL-p2X-PLM	7725	1034	82,85	38,37
pMAL-p2X-PLK	7657	968	80,14	35,66
pMAL-p2X-POL	7640	945	78,09	34,61
pMAL-c2X-PLL	7681	1067	92,75	39,91
pMAL-c2X-PLM	7648	1034	91,21	38,37
pMAL-c2X-PLK	7582	968	88,50	35,66
pMAL-c2X-POL	7563	945	87,45	34,61
pTYB4-PLL	8505	1058	94,91	39,91
pTYB4-PLM	8471	1025	93,37	38,37
pTYB4-PLK	8405	959	90,66	35,66
pET28c-POL	6198	943	35,54	34,61

„leere“ Vektoren	Vektor in bp	Proteinname	Protein in kDa
pMAL-p2X	6721	MBP	42,48
pMAL-c2X	6646	MBP	50,84
pTYB4	7474	CBD	57,00
pET28c	5369	His-Tag	0,93

4.4 DNA-Klonierung

4.4.1 Herstellung chemokompetenter Zellen (Hanahan *et al.*, 1991)

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen (BL21 und TB1) wurde eine 30 – 40 ml *E. coli*-Flüssigkultur in LB-Medium mit 5 ml einer über Nacht Kultur angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml TFB I-Puffer gelöst und erneut für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml TFB II-Puffer gelöst und wurde bei -80°C eingefroren.

TFB I-Puffer

Kaliumacetat	30 mM
Rubidium-Chlorid	100 mM
Calciumchlorid	10 mM
Mangan-Chlorid	50 mM
Glycerin	15% v/v
pH (mit Essigsäure einstellen)	5,8

TFB II-Puffer

MOPS	10 mM
Calciumchlorid	75 mM
Rubidium-Chlorid	10 mM
Glycerin	15% v/v
pH (mit NaOH einstellen)	6,5

4.4.2 PCR (Saiki *et al.*, 1988)

Für die Herstellung der verschiedenen Konstrukte wurden die vier verschiedenen langen *sbp*-Sequenzen mit unten angegebenen PCR-Ansatz amplifiziert (siehe 4.3.1). Der fertige Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet.

PCR-Ansatz

10x PCR-Puffer	5 µl
100 mM dNTP	je 0,5 µl
50 mM MgCl ₂	2,5 µl
<i>Acidianus</i> - DNA	0,625 µl
Taq/Pfu-Polymerase-Mix	0,3 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl
25 pmol Primermix	1 µl (siehe Tab.5)

Taq-/Pfu-Polymerase-Mix

Taq-Polymerase	20 µl
Pfu-Polymerase	1 µl

Tabelle 6: PCR-Temperaturen und Zeiten im Robocycler Gradient 40 (Stratagene).

Zyklus	Denaturierungsphase		Hybridisierungsphase		Verlängerungsphase	
	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	94	5.00	48-56	2.00	72	2.30
2 - 3	94	0.45	48-56	2.00	72	2.30
4 - 38	94	0.45	52-64	2.00	72	2.30
39	94	0.45	52-64	2.00	72	5.00

4.4.3 Restriktionsspaltung (Sambrook & Russel, 2001)

Restriktionsansatz:

Plasmid-DNA	0,5 – 1 µg
Restriktionsenzym	10 U
enzymspezifischer Puffer	2,0 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
BSA	0,2 µl

Der Restriktionsansatz wurde 1 – 2 h bei 37° C inkubiert (Ausnahme *Apa* I: 25° C). Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 65° C für 20 min (Ausnahme *Bgl* II und *Bcu* I). Die verwendeten Restriktionspuffer wurden spezifisch für das jeweilige Enzym nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.4.4 Ligation (Sambrook & Russel, 2001)

Die Ligation für die pTYB4- und pET28c-Konstrukte wurde bei 4°C üN mit unten aufgeführten Ligationsansatz durchgeführt. Für die pMAL-c2X- und pMAL-p2X-Konstrukte wurden 0,5 µg Vektor, 1 µg Insert-DNA und 11 µl H₂O gemixt, 5 min bei 45° C inkubiert und 2 µl Puffer und 1 µl Ligase zugegeben. Die Ligation wurde 2 h bei 16° C durchgeführt und der Ansatz danach 5 min bei 65° C inkubiert.

Ligationsansatz:

10 x Puffer	4 µl
Insert-DNA	11,5 µl
T4-Ligase [1 U / µl]	0,5 µl
Plasmid-DNA	2 µl

4.4.5 Transformation (Hanahan *et al.*, 1991)

Bei pTYB4- und pET28c-Konstrukten wurden zunächst TopF10'-Zellen mit diesen transformiert. Die Retransformation erfolgte mit BL21-Zellen. Für beide Transformationen wurde 0,5 µl Ligationsansatz zu 40 µl Zellen gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock (1½ min, 42° C) wurde der Transformationsansatz 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Regeneration der Zellen erfolgte 30 min – 1 h bei 37° C.

Bei pMAL-p2X- und pMAL-c2X-Konstrukten wurden für die Transformation TB1-Zellen verwendet. Dabei wurde 5 µl Ligationsansatz zu 25 µl Zellen gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (2 min bei 42° C), wurden 100 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 20 min bei 37° C regeneriert.

Neben den Expressionsplasmiden wurde in alle TB1-Zellen das Hilfsplasmid CodonPlus kloniert. Die BL21-Zellen enthielten dieses Hilfsplasmid bereits. CodonPlus besitzt ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Es codiert die tRNA's *arg* U, *ile* Y und *leu* W, die in *E. coli* unterrepräsentiert sind, aber in *Acidianus* häufig gebraucht werden. Dadurch sollte die Translation in *E. coli* besser gewährleistet sein.

4.4.6 Plasmidisolierung

Für die Plasmidpräparation wurden 5 ml einer LB-Übernachtskultur (ÜNK) verwendet. Die Isolierung der Plasmide aus den zentrifugierten Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden).

4.4.7 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurde statt gereinigter DNA mit einem Zahnstocher Teile einer Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und verwendet.

Kolonie-PCR-Ansatz

10x PCR-Puffer	2 µl
100 mM dNTP	je 0,2 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl
Zellmaterial	
Taq-/Pfu-Polymerase	0,2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
je 25 pmol Primermix	0,9 µl

Tabelle 7: Bedingungen der Kolonie-PCR im Robocycler Gradient 40 (Stratagene).

Zyklus	Denaturierungsphase		Hybridisierungsphase		Verlängerungsphase	
	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	5.00	95	0.30	54	1.30	70
2-34	0.30	95	0.30	54	1.30	70
35	0.30	95	0.30	54	5.00	70

4.5 Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die Kettenabbruchssequenzierung wurde mit dem SequiTherm EXCEL II Long-Read Sequencing Kit-LC (BIOzym) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenz-PCR (Tab.8) wurde der Robocycler Gradient 40 (Stratagene) verwendet. Für die Sequenzbestimmung von Fragmenten in pTYB4 wurden die IRD 800 5'-fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide T7 und Cyb2 benutzt (Sequenz siehe 1.5). Für pET-28c-Fragmente wurde ebenfalls das Oligonukleotid T7 benutzt. Als Gel wurde ein Acrylamidgel verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Auftrennung und Detektion der Fragmente erfolgte mit dem LICOR DNA Sequencer 4000 (1200 V, 35 mA, 50 °C, 7 h).

Tabelle 8: Bedingungen der Sequenz-PCR im Robo Robocycler Gradient 40 (Stratagene).

Zyklus	Denaturierungsphase		Hybridisierungsphase		Verlängerungsphase	
	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]
1	5.00	95	0.30	54	2.00	72
2-32	0.30	95	0.30	54	2.00	72
33	---	---	---	---	10.00	72

Sequenzgelansatz

Harnstoff	25 g
ddH ₂ O	21 ml
Long Ranger 50% (Acrylamidlösung)	5 ml
10x TBE-Puffer	5 ml
10%iges APS	250 µl
TEMED	35 µl

10 x TBE-Puffer für Sequenzgele

Tris	107,8 g
Borsäure	55 g
EDTA	7,4 g
H ₂ O	ad 1 l

4.6 Nachweis von *sbp*-DNA

4.6.1 Herstellung einer *sbp*-DNA-Sonde

Gereinigtes PCR-Amplifikat (SBP-POL) wurde für 2 min bei 80° C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37° C inkubiert, die Reaktion anschließend mit 7 µl EDTA-Lösung (0,25 M) gestoppt und 7,5 µl LiCl (4 M) sowie 225 µl Ethanol zugegeben. Die gefällte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Sediment wurde in 100 µl TE (pH 8,0) gelöst und 30 min bei 37° C inkubiert.

Vor Gebrauch wurde die Sonde zwei Minuten bei 100° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit Hybridisierungslösung (im Verhältnis 1:3000) versetzt.

Ansatz:

denaturierte DNA	50 µl
10x Hexanukleotide	6 µl
10x dNTP mix DIG Markierungsgemisch	6 µl
Klenow-Enzym [2 U / µl]	2 µl

4.6.2 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975; Sambrook & Russel, 2001)

Für die Detektion von *sbp*-DNA-Sequenzen wurde genomische DNA von *Acidianus* mit geeigneten Restriktionsenzymen hydrolysiert und die Fragmente mit einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die partielle Depurinierung der DNA wurde das Gel in Depurinierungslösung (10 min), zur anschließenden Denaturierung in Denaturierungslösung (20 min) geschwenkt. Nach Inkubation in Neutralisierungspuffer (20 min) erfolgte die Übertragung der Fragmente mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran über Nacht (üN). Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Die kovalente Bindung der DNA-Fragmente an die Membran erfolgte für 2 h bei 80° C. Anschließend folgte die Vorhybridisierung (1 – 2 h, 42° C) und Hybridisierung (üN, 42° C) der Membran.

Nach Waschen der Membran (2 x 15 min bei RT und 2 x 15 min bei 60°C in Lsg. 1, 2 – 3 min in Waschpuffer, 30 min in Puffer 2), folgte die Inkubation mit dem DIG-Antikörper (30 min). Die Membran wurde anschließend (2 x 15 min in Waschpuffer, 3 – 5 min in Puffer 3) gewaschen und 5 min in CSPD-Lösung inkubiert. Danach folgte die Exponierung.

Depurinierungslösung

HCl 0,25 M

Denaturierungslösung

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 M

Neutralisierungspuffer

NaCl	1,5 M
Tris / HCl	0,5 M
pH	7,5

20 x SSC

NaCl	700 g
Natriumcitrat (pH 7,0)	352 g
H ₂ O	ad 4 l

Hybridisierungslösung

Formamid	50%
SSC	5 x
Blockierungsreagenz	2%
Laurylsarcosin	0,02%
<u>Lsg. 1</u>	

Sondenlösung

Hybridisierungslösung	20 ml
Sonde	25 µl

SSC	2x
SDS	0,1%

Waschpuffer

TWEEN 20	0,3%
Puffer 1	1x

5 x Puffer 1

Maleinsäure	0,5 M
NaCl (pH 7,5)	0,75 M

Puffer 2

Blockierungsreagenz	1%
Puffer 1	1x

CSPD-Lösung

CSPD	1 ml
Puffer 3	100 ml

Antikörperlösung

polyklon. Schafs-Anti-DIG-Antikörper	4 µl
Puffer 2	40 µl

Puffer 3

Tris / HCl (pH 9,5)	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	50 mM

5 Expression in *E.coli*

5.1 Expression

5.1.1 Expression in BL21-Zellen

5 ml Vorkulturen wurden über Nacht bei 37° C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (für pTYB4 Ampicillin + Chloramphenicol, für pET28c Kanamycin + Chloramphenicol) geschüttelt. Mit diesen Vorkulturen wurden Hauptkulturen auf eine Anfangs-oD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Expression erfolgte bei 37° C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (für pTYB4 Ampicillin, für pET28c Kanamycin). Bei einer oD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 wurden die Zellen mit 20 µM IPTG induziert. Nach 12 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

5.1.2 Expression in TB1-Zellen

Die Hauptkulturen wurden mit einer Übernachtskultur auf eine Anfangs-oD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Expression erfolgt in SB-Ampicillin-Medium bei 37° C. Bei einer oD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 werden die Zellen mit 300 µM IPTG induziert und nach 3 h geerntet.

5.2 Zellfraktionierung

5.2.1 Fraktionierung bei pTYB4- und pET28c-Konstrukten

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GS3, Sorvall, 8 000 x g, 10 min) vom Kulturüberstand getrennt. Nach Resuspendierung in WL.B-Puffer erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall (3 x 10 min, pulsierend; Saito *et al.*, 1987; Belder *et al.*, 1988). Nach anschließender Zentrifugation (GS3, Sorvall, 8 000 x g, 10 min) wurde das Sediment in WL.B-Puffer resuspendiert.

5.2.2 Fraktionierung bei pMAL-c2X-Konstrukten

Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (Sorvall, GS3, 4 000 x g). Das Sediment wurde in 5 ml CB-Puffer resuspendiert und über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Zellsuspension durch Ultraschallbehandlung (2 min) aufgeschlossen, 20 min zentrifugiert (SS34, 9 000 x g, Sorvall) und das Sediment in 1 ml CB-Puffer resuspendiert.

5.2.3 Fraktionierung bei pMAL-p2X-Konstrukten

Zunächst wurde die Zellsuspension in 2 Teile geteilt. Nach 10 min Zentrifugation (Sorvall, GS3, 4 000 x g) wurde das erste Sediment in 10 ml PP-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl EDTA (0,5 M) 10 min bei RT geschüttelt und anschließend 10 min zentrifugiert (8 000 x g, SS34, Sorvall). Das Sediment wurde in 10 ml eiskalten MgSO₄ (5 mM) resuspendiert und 10 min schüttelnd im Eisbad inkubiert. Danach wurde die Suspension 10 min zentrifugiert (8 000 x g, SS34, Sorvall). Der Überstand enthielt die periplasmatischen Proteine.

Das zweite Sediment wurde in 5 ml CB-Puffer resuspendiert und über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in der Suspension 2 min durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation (SS34, 9 000 x g) wurde das Sediment, welches die Membranfraktion und *inclusion bodies* enthält, in 1 ml CB-Puffer resuspendiert. Im Überstand befanden sich die cytoplasmatischen Proteine.

5.3 Säulenaufreinigung von Fusionsproteinen

5.3.1 Chitin-Beads-Säulen

Fusionsproteine hergestellt mit dem Expressionssystem BL21 x CP x pTYB4-SBP enthielten hinter dem Intein eine Chitinbindedomäne (CBD), die spezifisch an die Chitin Beads des

Säulenmaterials binden konnte. Zur Detektion von Zielprotein im Cytoplasma wurde die Proteinfraction über die Säule gegeben. Zur Isolierung von Zielprotein aus der Membranfraction wurden zunächst die Proteine mit 8 M Harnstoff entfaltet und durch Zentrifugation das Sediment entfernt. Auf die Säule wurde das lösliche Membransolubilisat gegeben. Die Säulenaufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt/ Main). Um das Fusionsprotein zu erhalten, wurde das Standardprotokoll insofern modifiziert, als dass nach dem Waschen mit Column Buffer sofort das gesamte Fusionsprotein mit Stripping Buffer eluiert wurde.

Column-Buffer:

Tris/HCl	20 mM
NaCl	500 mM
EDTA	0,1 mM
Triton X-100	0,1%
pH	8,0

Stripping Buffer:

Tris/HCl	20 mM
NaCl	0,5 M
SDS	1%
pH	8,0

5.3.2 Amylose-Säulen

Das mit dem Expressionssystem TB1 x CP x pMAL-c2X-SBP oder TB1 x CP x pMAL-p2X-SBP hergestellte Fusionsprotein bestand aus Zielprotein (SBP) und Maltose-Binde-Protein (MBP). Das MBP konnte spezifisch an die Amylose-Säulen binden. Die Säulenaufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt/ Main). Um das Fusionsprotein zu erhalten wurde auch hier auf die Spaltung mit dem Factor Xa verzichtet und stattdessen nach dem Waschen mit CB-Puffer (siehe 1.4) sofort das Fusionsprotein mit CBM-Puffer eluiert.

CBM-Puffer:

EDTA	2 mM
TWEEN 20	1,5%
KPi	100 mM
Glycerin	10%
Maltose	10 mM
pH	8,0

6 RNA-Analysen

6.1 Isolierung von RNA aus *Acidianus* (Sambrook & Russel, 2001)

15 l Fermenter wurden mit *Acidianus* anaerob mit Schwefel sowie aerob mit Tetrathionat, Schwefel und Schwefel + Tetrathionat als Schwefelquelle kultiviert. Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h wurden je 3 l Kulturüberstand entnommen und zentrifugiert.

Für die RNA-Isolierung wurde das Zellsediment in 1 ml Lösung D resuspendiert und in 5 ml Zentrifugenbecher überführt. Nach Zugabe von 100 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml Aqua-Phenol (Roth, Karlsruhe) und 210 µl Chloroform / Isoamylalkohol (49:1), wurde der Ansatz 10 s gemixt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 20 min zentrifugiert (Sorvall, 10 000 rpm, SS34). Zur wässrigen Phase wurde 1 ml Isopropanol gegeben und der Ansatz 1 h bei – 20° C inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut 20 min zentrifugiert (10 000 x g, 4° C, Eppendorf). Das Sediment wurde mit 300 µl Lösung D versetzt und 10 min bei 56° C schüttelnd inkubiert. Nach Extraktion mit 300 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (24:1:25), wurde der Ansatz 3 min bei RT zentrifugiert (13 000 x g, Eppendorf). Zur wässrigen Phase wurden 300 µl Chloroform zugegeben und üN bei – 20° C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 10 min bei 4° C zentrifugiert (13 000 x g, Eppendorf). Das Sediment wurde in Ethanol gewaschen, getrocknet und in geeigneter Menge H₂O_{DEPC} gelöst.

6.2 Northern-Analysen (Ausubel et al., 1988)

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte einerseits photometrisch. Dabei entspricht eine optische Dichte bei 260 nm von 1 gleich 30 µg / ml RNA (Lottspeich & Zorbas, 1998b). Andererseits wurde die RNA-Konzentration durch analytische Agarosegelelektrophorese bestimmt.

Die RNA wurde elektrophoretisch über ein denaturierendes formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Als Gelauftragspuffer wurde dabei RNA-Mix verwendet. Der Transfer der RNA erfolgte im Kapillarblot auf eine Nylonmembran, mit 20 x SSC als Transferpuffer. Die RNA-Fragmente wurden für 2 h bei 80° C kovalent an die Nylonmembran gebunden. Durch Färbung der Membran mit Methylenblau (Herrin & Schmidt, 1988), konnte die Qualität der RNA anhand der Bandenschärfe der 16S- und 23S-RNA analysiert werden. Die Membran wurde anschließend in H₂O wieder entfärbt. Die Prähybridisierung erfolgte 2 h bei 42° C, die Hybridisierung bei 42° C über Nacht. Die Membran wurde anschließend in Lösung 1 (20 min bei 55° C, 30 min bei 60° C sowie 30 min 65° C) gewaschen (Lösung siehe Southern-Hybridisierung). Die folgenden Waschrinne entsprachen denen des Southern-Blots (siehe 4.5.2).

10 x MOPS-Laufpuffer:

MOPS (pH 7,0)	0,2 M
3 M Natriumacetat *	16,6 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0) *	20,0 ml
DEPC-H ₂ O	ad 1l

* DEPC behandelt

RNA-Mix:

Formamid	250 µl
36% Formaldehyd	83 µl
Gelpuffer (pH 8,0)	50 µl
DNA/RNA-Auftragspuffer	50 µl

Methylenblau:

Methylenblau (w/v)	0,04%
Natriumacetat (pH 5,5)	0,5 M

Hybridisierungslösung:

deionisiertes Formamid	50%
SDS	1%
Dextransulfat	10%
SSP	1 x
Magermilchpulver	0,5%

6.3 Primerextension (Heumüller, 2004; Sambrook & Russel, 2001)

Für die Primerextension wurde das IRD 800 5'-fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid *sbp_primerext* verwendet (siehe 1.5 & VIII.1). 5 µg RNA wurden mit 10 pmol Primer 10 min bei 85° C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 10 mM dNTP-Mix und 20 U Ribonuclease-Inhibitor, wurde der Ansatz auf 19 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt und 5 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 200 U reverse Transkriptase (RevertAid™ M-MuLV, Fermentas) zugegeben und 1 h bei 42° C inkubiert. Die Reaktion wurde dann für 10 min bei 70° C gestoppt und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 2 µl Stop/Loading Puffer versetzt (SequiTherm EXCEL II Long-Read Sequencing Kit-LC, BIOzym), 5 min bei 90° C denaturiert und auf ein Sequenzgel aufgetragen (siehe 4.5). Als Größenvergleich diente eine daneben aufgetragene Sequenz-PCR.

7 Schwefelverbindungen**7.1 Colorimetrische Bestimmungen****7.1.1 Cyanolyse (Kelly *et al.*, 1969)**

Durch Cyanolyse konnten die Konzentrationen von Tetrathionat, Thiosulfat und Trithionat in Gemischen bestimmt werden. Dazu wurde in drei Parallelansätzen je 50 µl des zu untersuchenden Gemischs mit je 150 µl NaH₂PO₄-Puffer und 300 µl ddH₂O gemischt und auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurden je 250 µl Kaliumcyanid (100 mM) zugegeben, die Ansätze rasch gemischt und weitere 10 min bei 4° C inkubiert.

Zur Tetrathionatgehaltsbestimmung wurde der Parallelansatz A 20 min bei 4° C inkubiert.

Ansatz B zur Thiosulfatgehaltsbestimmung wurde 10 min bei 4° C inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl Kupfersulfat wurde der Ansatz rasch gemischt und erneut für 10 min bei 4° C inkubiert.

Zur Trithionatgehaltsbestimmung wurde der Ansatz C für 45 min im Wasserbad gekocht und anschließend auf 4 ° C abgekühlt. Nach Zugabe von 75 µl Kupfersulfat (100 mM) wurde der Ansatz rasch gemischt und weitere 10 min bei 4° C inkubiert.

Zu allen drei Ansätzen wurden dann 150 µl ENP-Gemisch gegeben. Die fertigen Ansätze wurden unter Schütteln auf 25° C erwärmt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 460 nm. Die Tetrathionatkonzentration ergab sich direkt aus der gemessenen Absorption des Ansatzes A. Die Thiosulfatkonzentration wurde aus der gemessenen Absorption des Ansatzes B abzüglich des zweifachen Wertes der Absorption des Ansatzes A berechnet. Die Trithionatkonzentration ergab sich aus der Subtraktion der Anfangsabsorption des Ansatzes B von der Absorption des Ansatzes C. Die Eichung erfolgte über eine SCN-Reihe.

NaH₂PO₄- NaOH-Puffer

100 mM NaH ₂ PO ₄	50 ml
100 ml NaOH	39,1 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml
pH	7,4

ENP-Gemisch

1,5 M Eisennitrat	60,6 g
4 M Perchlorsäure	57,4 ml
ddH ₂ O	ad 0,1 l

7.1.2 Sulfit-Gehaltsbestimmung (Pachmayr, 1960)

50 µl Fuchsinlösung wurden mit 195 µl H₂O und 250 µl der zu untersuchenden Substanz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Formaldehydlösung (32%) wurde für weitere 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Fuchsinlösung

Fuchsin	0,04 g
ddH ₂ O	87,5 ml
H ₂ SO ₄ konz.	12,5 ml

7.1.3 Sulfid-Gehaltsbestimmung (Cline, 1969; Widdel, 1980)

500 µl Probe der zu untersuchenden Lösung wurden mit 1,5 ml Reagenz gemixt. Innerhalb einer Minute wurde die Absorption bei 436 nm gemessen.

Reagenz

HCl	50 mM
CuSO ₄	5 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

7.1.4 Schwefel-Gehaltsbestimmung (Chan & Suzuki, 1993)

500 µl Probe der zu untersuchenden Lösung wurden mit 1000 µl Petrolether 30 s gemischt und anschließend 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert. 500 µl der oberen Phase wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1000 µl Lösung (2) gemischt. Nach 2 min Inkubation bei RT wurden 500 µl entnommen und zu einem Gemisch aus 950 µl Aceton

mit 50 µl Lösung (3) gegeben und nochmals gut gemischt. Nach 1 min Zentrifugation bei 14000 x g wurde die Absorption des Überstandes bei 464 nm bestimmt.

Lösung (1)

ddH ₂ O	10 ml
Aceton	190 ml

Lösung (2)

NaCN	0,2 g
Lösung (1)	125 ml

Lösung (3)

FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,4 g
ddH ₂ O	5 ml

Stammlösung für die Eichreihe

Schwefel	6,4 mg
DMSO	ad 10 ml

7.1.5 Sulfat-Gehaltsbestimmung (Tabatabai, 1974; Cypionka, 1986)

500 µl Probe der zu untersuchenden Lösung wurden mit 500 µl Lösung A schlierenfrei gemischt. Nach Zugabe von 125 µl Lösung B und sofortigem gründlichem Mischen wurde der Ansatz 30 – 45 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut gemischt und die Absorption bei 436 nm gemessen.

Lösung A

Citrat x H ₂ O	10 g
ddH ₂ O	ad 80 ml
Glycerin	120 ml

Lösung B

BaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 g
Citrat x H ₂ O	5 g
ddH ₂ O	ad 50 ml

7.1.6 XAD-Säulenaufreinigung

XAD (Supelco) ist ein Absorberharz, welches niedermolekulare Verbindungen binden kann. Es wurden 300 g Säulenmaterial für 500 ml zu untersuchendem Überstand verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) 15 min äquilibriert und mit 100 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurde der zu untersuchende Überstand auf die Säule gegeben und 10 min inkubiert. Nach Waschen der Säule mit Wasser, erfolgte die Elution mit 500 ml Methanol oder Aceton.

7.1.6 Berechnungen und Diagramme

Alle Diagramme wurden mit dem Programm Excel erstellt. Die Standardabweichung wurde vom Programm mit StabW berechnet.

Die Skala der y-Achse wurde im oberen Bereich komprimiert. Dazu wurden in Excel die Messwerte der neuen Skala angepasst.

7.2 Dünnschichtchromatographie

Als Platten wurden fluoreszierende Kieselgelplatten (HPTLC Platten, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) als Laufmittel Isopropanol: Ammoniak: H₂O im Verhältnis 3:1:1 verwendet (Zimmermann, 1999). Die fluoreszierenden Platten wurden einerseits direkt unter UV-Licht betrachtet, andererseits wurden spezifisch Schwefelverbindungen mit Palladiumchloridlösung angefärbt (Bäumler & Rippstein, 1961; Burger & Berninger, 1958).

Palladiumchlorid-Lösung

Palladium(II)-chlorid	0,5 g
ddH ₂ O	100 ml
25% HCl	einige Tropfen

IV Ergebnisse

1 Schwefelverbindungen

Acidianus ist bekannt dafür, dass er aerob mit Schwefel wachsen kann. Das initiale Enzym dieses Stoffwechselweges ist die Schwefel-Oxygenase-Reduktase (SOR), welche vollständig im Cytoplasma lokalisiert ist. Damit muss der Schwefel (S^0) für die im Cytoplasma stattfindenden Reaktionen mobilisiert und in die Zelle transportiert werden. Bislang ist allerdings unbekannt, wie die dafür notwendigen Reaktionen ablaufen.

Um Zwischenverbindungen des extrazellulären aeroben Schwefel-Stoffwechsels zu finden, wurden Kulturen mit Schwefel oder mit alternativen Schwefelverbindungen (Tetrathionat und Thiosulfat) angezogen. Vermutet wird, dass der elementare Schwefel aktiviert und in eine transportierbare Schwefelverbindung umgewandelt wird.

1.1 Wachstum

1.1.1 Physiologische Untersuchungen

Für physiologische Untersuchungen wurden Kulturen mit verschiedenen Schwefelverbindungen bzw. Schwefel angezogen (Tab.9).

Tabelle 9: Übersicht über die verschiedenen Anzuchten.

Kulturname	Medium	Zusatz	Zugabe ab
S^0	<i>Acidianus</i> -Medium	1% Schwefel	0 h
TT	<i>Acidianus</i> -Medium	10 mM Kaliumtetrathionat	0 h
TS	<i>Acidianus</i> -Medium	10 mM Natriumthiosulfat	0 h
ST	<i>Acidianus</i> -Medium	1% Schwefel + 10 mM Kaliumtetrathionat	0 h
TA	<i>Acidianus</i> -Medium	10 mM Kaliumtetrathionat 1% Schwefel	0 h 48 h
AM	<i>Acidianus</i> -Medium	keine verwertbaren Schwefelverbindungen	---
TB	Trypton-Brock	keine verwertbaren Schwefelverbindungen	---

Das Wachstum der Kulturen wurden durch Bestimmung der Zellzahl und der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt (Abb.16). Kulturen, mit Natriumthiosulfat als Schwefelquelle, zeigten eine minimale Vermehrung der Zellzahl in den ersten 24 h, die dem der Zellen im Medium ohne verwertbare Schwefelverbindungen (AM) entsprach. Anschließend zeigten beide kein Wachstum mehr (Abb. 16). Dieses Wachstum war auf die vorhandenen Schwefelreste aus der Kryokonserven zurückzuführen. Die Zellen, mit Tetrathionat bzw. Schwefel als Schwefelquelle, wuchsen an. Zellen, welche mit Kaliumtetrathionat als

Schwefelquelle angezogen wurden, zeigten dabei einen höheren Zelltiters sowie eine höhere oD_{600} als die Vergleichskulturen mit Schwefel. Der pH-Wert sank bei beiden Vergleichskulturansätzen gleichermaßen auf 1,0 ab.

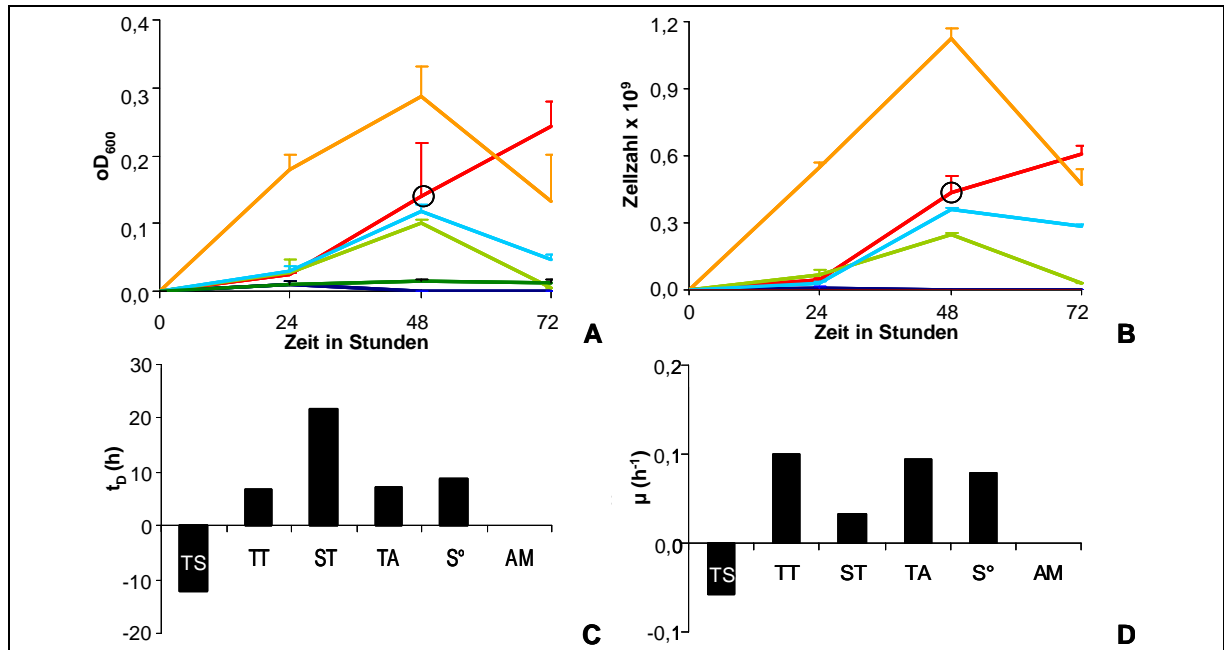


Abbildung 16: Wachstumsanalyse von *Acidianus*-Kulturen.

A. Wachstumskurve basierend auf der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm,

B. Wachstumskurve basierend auf der Zellzahlbestimmung nach Thoma, C. Verdopplungszeit t_D [h],

D. spezifische Wachstumsrate μ [h⁻¹]; Die Fehlerbalken basieren auf je 3 Wiederholungen.

— / TS = 10 mM Natriumthiosulfat,

— / TA = zunächst mit 10 mM Kaliumtetrathionat, danach Zugabe von 1% Schwefel

— / S° = 1% elementaren Schwefel

— / ST = 1% elementarem Schwefel und 10 mM Kaliumtetrathionat

— / TT = 10 mM Kaliumtetrathionat,

— / AM = ohne verwertbare Schwefelverbindungen,

○ Zugabe von 1% Schwefel, ■ 24 – 48 h.

Kulturen, die zunächst nur mit Tetrathionat und nach 48 zusätzlich Schwefel bekamen (TA-Kulturen), zeigten nach der Schwefelzugabe eine weitere Zellzahlzunahme im Gegensatz zu den Tetrathionat-Kulturen (TT). Kulturen, die gleichzeitig mit Schwefel und Tetrathionat angezogen wurden (ST-Kulturen), zeigten hingegen von Beginn an eine höhere oD_{600} und eine schnellere Zunahme der Zellzahldichte als alle anderen Kulturen. Auch bei diesen Kulturen sank der pH-Wert auf 1,0 ab. Aus den Wachstumskurven wurden die t_D -Werte und daraus die μ -Werte bestimmt (Abb.16). Weiterhin wurden alle 24 h die Kulturen mikroskopisch auf die Anzahl der vorhandenen Zellen hin überprüft (Abb.17).

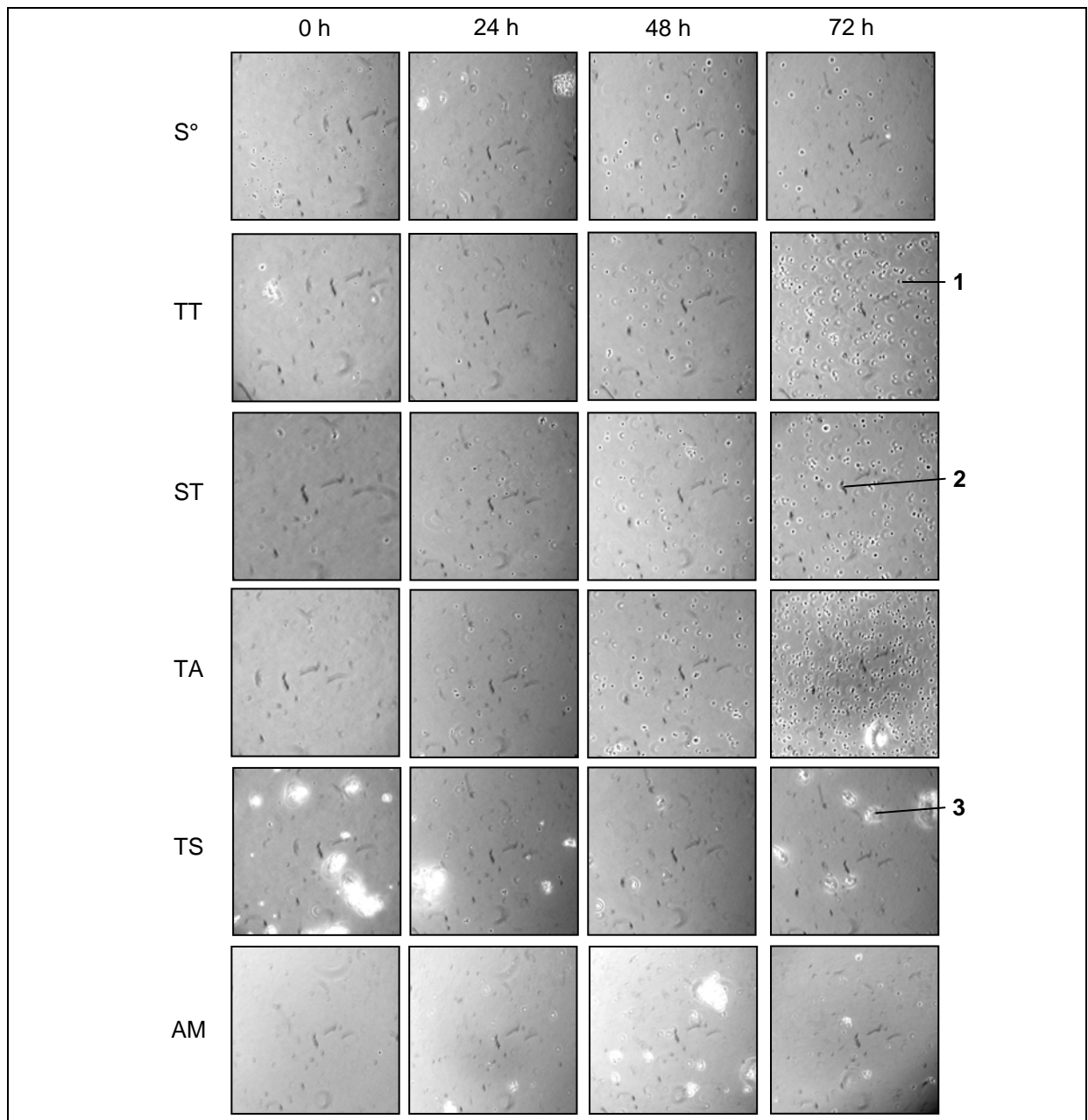


Abbildung 17: Fotos der Mikroskopie von je 1000 μ l *Acidianus*-Kulturmedium.

Alle 24 h wurde je 1 ml Kultur entnommen, zentrifugiert (13 000 x g, 5 min) und in 10 μ l Medium resuspendiert. Dieses Resuspendat wurde vollständig auf einen Objektträger gegeben und mikroskopiert. 1 = *Acidianus*-Zellen, 2 = ausgefallene Kompartimente, 3 = Schwefel.

1.1.2 Überprüfung der Kulturreinheit

Da im Labor schon mal eine Kontamination einer *Acidianus*-Kultur mit *Sulfurisphaera* MC1 aufgetreten war (Urich, 2001), wurde die Reinheit dieser *Acidianus*-Kulturen mit PCR überprüft. Genomische DNA wurde mittels universellen Archaea-spezifischen Oligonukleotiden (Archaea 20F/ 958 R) und anschließender Restriktion mit *Tru I* überprüft (Abb.18). Dabei sollten sich für *Acidianus* und *Sulfurisphaera* völlig unterschiedliche Bandenmuster auf einem Agarosegel ergeben (Tab.10).

Tabelle 10: Durch Sequenzanalyse vorhergesagte DNA-Fragmentgrößen des ARDRA-Musters (Urich, 2001).

Vorhergesagte Banden für <i>Acidianus</i> -DNA	527 bp, 310 bp, 66 bp, 35bp
Vorhergesagte Banden für <i>Sulfurisphaera</i> -DNA	373 bp, 269 bp, 190 bp, 66 bp, 41 bp

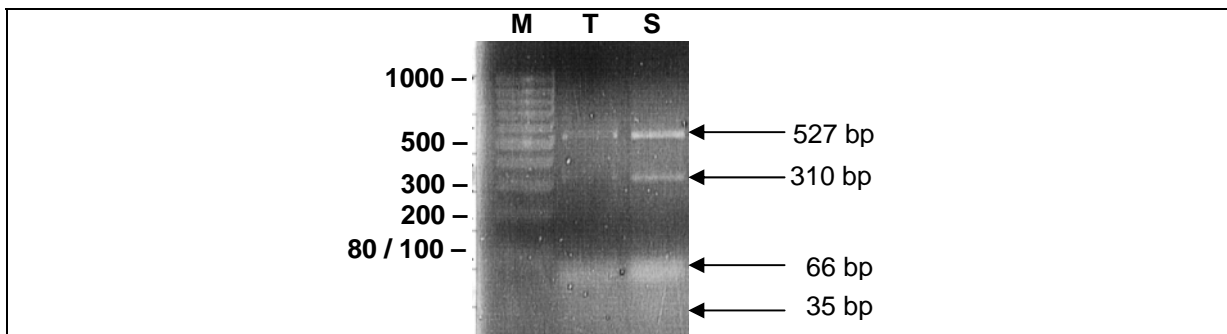


Abbildung 18: 4% Agarosegel mit *Tru* I-restringierten PCR-Produkten.

M = Größenstandard #SM0241 in bp, T = restringiertes DNA-Amplifikat von Zellen, die mit Tetrathionat gewachsen waren, S = restringiertes DNA-Amplifikat von Zellen, die mit Schwefel gewachsen waren.

Das Bandenmuster zeigte vier eindeutige Banden der Größen 527, 310, 66 und 35 bp. Banden, die *Sulfurisphaera* zuzuordnen wären, fehlten.

Um eine Kontamination auszuschließen, wurden weiterhin *Acidianus*-Kulturen bei 93° C im *Acidianus*-Medium mit Schwefel, sowie bei 80° C im Trypton-Brock-Medium angezogen. Das Temperatur-Optimum von *Sulfurisphaera* beträgt 93° C im Gegensatz zu *Acidianus* ($T_{\text{Opt.}} = 80^\circ \text{C}$), der bei dieser Temperatur nicht mehr wachsen kann. Trypton-Brock-Medium ist das Wachstumsmedium von *Sulfolobus*. *Acidianus* kann in diesem Medium aufgrund fehlender verwertbarer Schwefelverbindungen nicht wachsen.

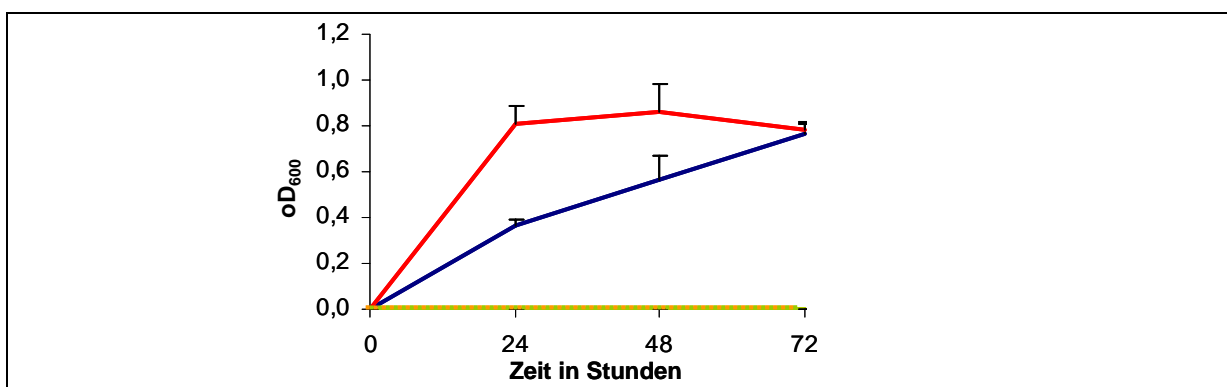


Abbildung 19: Wachstum von *Acidianus*-, *Sulfurisphaera* MC1- und *Sulfolobus*-Kulturen.

— *Sulfurisphaera* MC1 in *Acidianus*-Medium, — *Sulfolobus solfataricus* in Trypton-Brock-Medium, — *Acidianus* in Trypton-Brock-Medium, *Acidianus* bei 93° C in *Acidianus*-Medium; die Linien der *Acidianus*-Wachstumskurven liegen in beiden Fällen genau auf der x-Achse.

Die Vergleichskulturen von *Sulfurisphaera* MC1 und *Sulfolobus solfataricus* wuchsen in ihren entsprechenden Medien an. Die Kulturen von *Acidianus* wuchsen, wie erwartet in keinem dieser Medien (Abb.19).

1.2 Detektion von Schwefelverbindungen im Kulturüberstand bei aeroben Wachstum

Acidianus-Kulturen wurden mit verschiedenen Schwefelverbindungen und Schwefel angezogen (Tab.9). Von all diesen Kulturen wurden zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden Proben entnommen und zentrifugiert (13 000 x g, 5 min). Der Gesamtzellextrakt wurde auf seinen Schwefelgehalt hin überprüft. Die zellfreien Kulturüberstände wurden durch Colorimetrische Bestimmungen (GHB) und Dünnschichtchromatographie (DC) auf Vorhandensein und Konzentration der anorganischen Schwefelverbindungen (ASV) Tetrathionat, Thiosulfat, Trithionat, Sulfid, Sulfit und Sulfat hin untersucht. Bei der Dünnschichtchromatographie wurden zunächst mit UV-Licht alle aufgetrennten Banden auf der Platte detektiert. Anschließend wurden die Platten mit Palladiumchlorid besprüht, welches spezifisch nur Schwefelverbindungen anfärbt (Bäumler & Rippstein, 1961; Burger & Berninger, 1958).

Als Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden zu jeder Kultur 4 Mediumskontrollen mit verschiedenen pH-Werten (2,5; 2,0; 1,5 und 1,0) unter denselben Bedingungen inkubiert und mit denselben Methoden untersucht. Dabei lagen bei den Mediumskontrollen mit einem pH-Wert unter 2,5 die Anfangs-Sulfatgehalte (Tab.11) höher, da zur pH-Wert-Einstellung größere Mengen H_2SO_4 benötigt wurden.

Tabelle 11: Konzentrationen verschiedener Verbindungen im Medium der Kulturen.

		Konzentration der zugegebenen Verbindungen				
		Tetrathionat	Thiosulfat	Schwefel	Sulfat	Eisen
Schwefelquelle	Tetrathionat	10 mM	---	---	19,83 mM	0,55 mM
	Schwefel	---	---	1%	19,83 mM	0,55 mM
	Thiosulfat	---	10 mM	---	19,83 mM	0,55 mM
	Schwefel+Tetrathionat	10 mM	---	1%	19,83 mM	0,55 mM

1.2.1 Wachstum mit Schwefel

Beim aeroben Schwefelstoffwechsel wird Schwefel verbraucht, und es entsteht als zentrales Endprodukt der Zelle Sulfat, welches ausgeschieden wird, so dass eine Abnahme von Schwefel und eine Akkumulation von Sulfat im untersuchten Kulturüberstand erwartet wurde (Abb. 20).

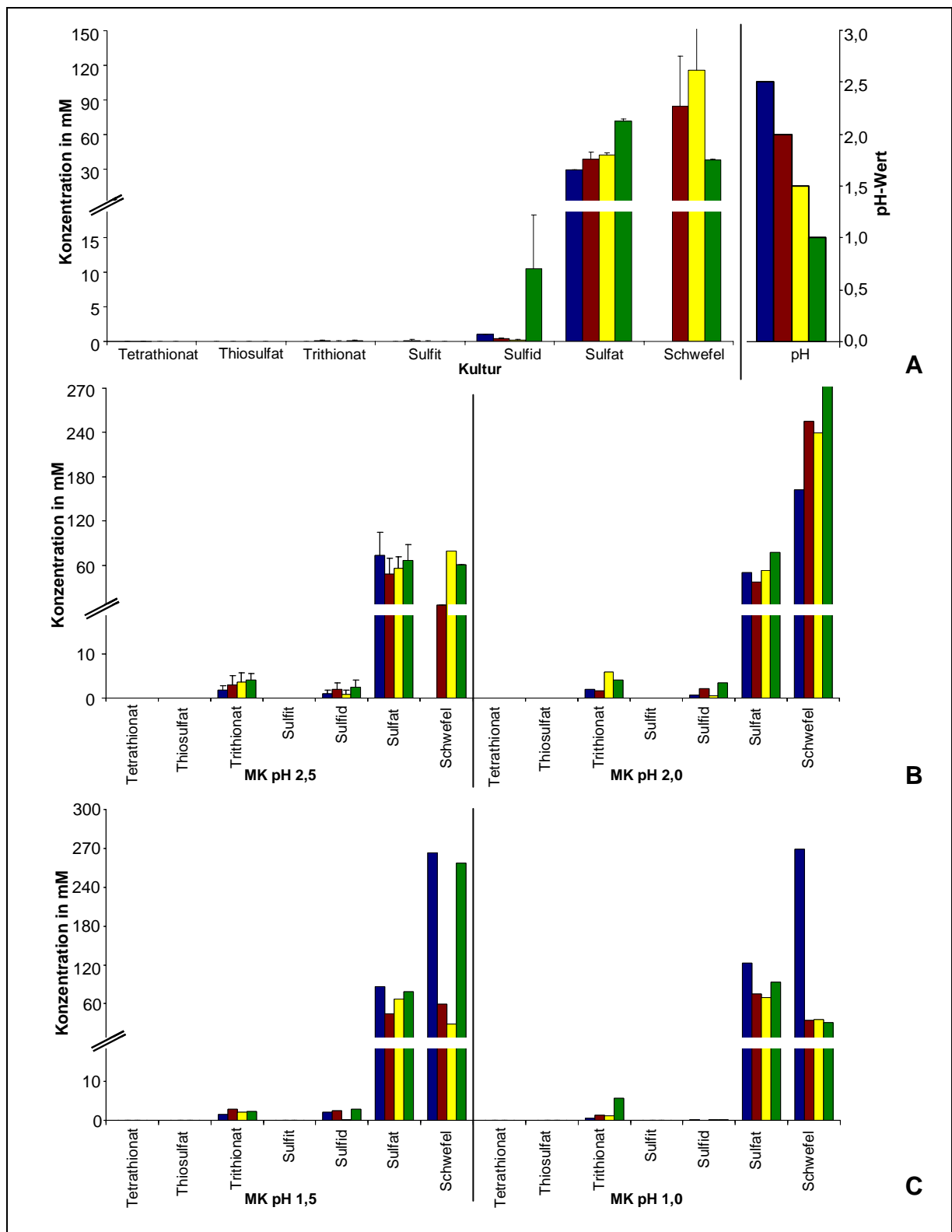


Abbildung 20: Analysen von Schwefel und ASV im Überstand von *Acidianus*-Kulturen und in Mediumskontrollen, bei Inkubation mit Schwefel.

Die Kulturen wurden mit 1% Schwefel bei 80° C angezogen, die Mediumskontrollen wurden ebenfalls mit 1% Schwefel unter denselben Bedingungen inkubiert. Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = GHb des Kulturüberstands (links) & Messung des pH-Wertes über die Zeit (rechts), B = GHb des Mediums mit den pH-Werten 2,5 (links) und 2,0 (rechts), C = GHb des Mediums mit den pH-Werten 1,5 (links) und 1,0 (rechts).

Im Kulturüberstand war die erwartete Schwefelabnahme und Sulfatakkumulation zu bemerken. Tetrathionat, Thiosulfat, Trithionat und Sulfid waren im Kulturüberstand weder in größeren Mengen vorhanden, noch wurden sie in größeren Mengen gebildet. In den Mediumskontrollen war ein Anstieg der Trithionatkonzentration zu detektieren.

Da die Schwefelgehaltsbestimmung sehr ungenau ist; wurde zusätzlich zur in Abb.20 dargestellten colorimetrischen Schwefelgehaltsbestimmung der gesamte Schwefel nach 72 h Kulturwachstum entnommen, getrocknet und gewogen (Tab.12).

Tabelle 12: Ergebnisse der gravimetrischen Gesamtschwefelmessung.

	Kultur		Mediumskontrolle	
	Anteil in g	Anteil in %	Anteil in g	Anteil in %
Gesamtschwefelgehalt	0,500	100,0	0,500	100,0
Entnahme für die Messungen (Gehaltsbestimmungen, siehe Abb.20)	0,204	40,8	0,204	40,8
bestimmter Schwefelgehalt nach 72 h	0,261	52,2	0,300	59,2
Verbrauch	0,035	7,0	0,000	0,0

Bei dieser Gesamtschwefel-Entnahme zeigte sich, dass rund 7% des Schwefels nach 72 h fehlten. Bei den Mediumskontrollen fehlte wie erwartet kein Schwefel (Tab.12).

Weiterhin wurden colorimetrische Gehaltsbestimmungen auch mit der Kultur (Kulturüberstand mit Zellen) durchgeführt. Dabei sollten Zwischenverbindungen, welche in der Zelle gebildet und weiter umgesetzt werden, detektiert werden (Abb.21).

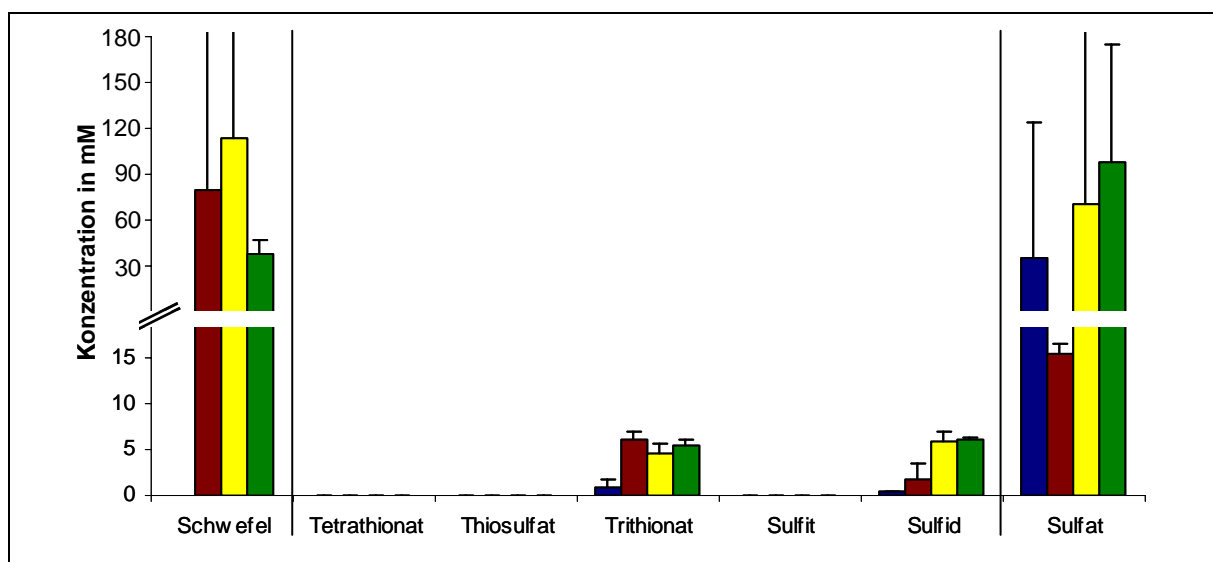


Abbildung 21: Analysen von Schwefel und ASV in der Kultur bei Kultivierung mit 1% Schwefel.

Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h.

Dabei zeigten sich die erwartete Schwefelabnahme und die Sulfatakkumulation. Tetrathionat, Thiosulfat und Sulfit konnten zu keiner Zeit detektiert werden. Eine Erhöhung der Trithionat-Konzentration in der Kultur war auch in der Mediumskontrolle (pH 1,0) zu detektieren und somit auf einen pH-Wert-Effekt zurückzuführen (siehe Abb. 21 & 22).

Weiterhin war eine Erhöhung der Sulfid-Konzentration in der Kultur um das 15-fache zu messen. Bei den Mediumskontrollen lag die Erhöhung nur bei 1,4 bis 5,3 (Abb.22). Die Erhöhung des Sulfidgehaltes im Kulturüberstand ist ein Artefakt, da bei Division von sehr kleinen Werten sehr große Quotienten entstehen (Vergleiche Abb. 20 und Abb.22).

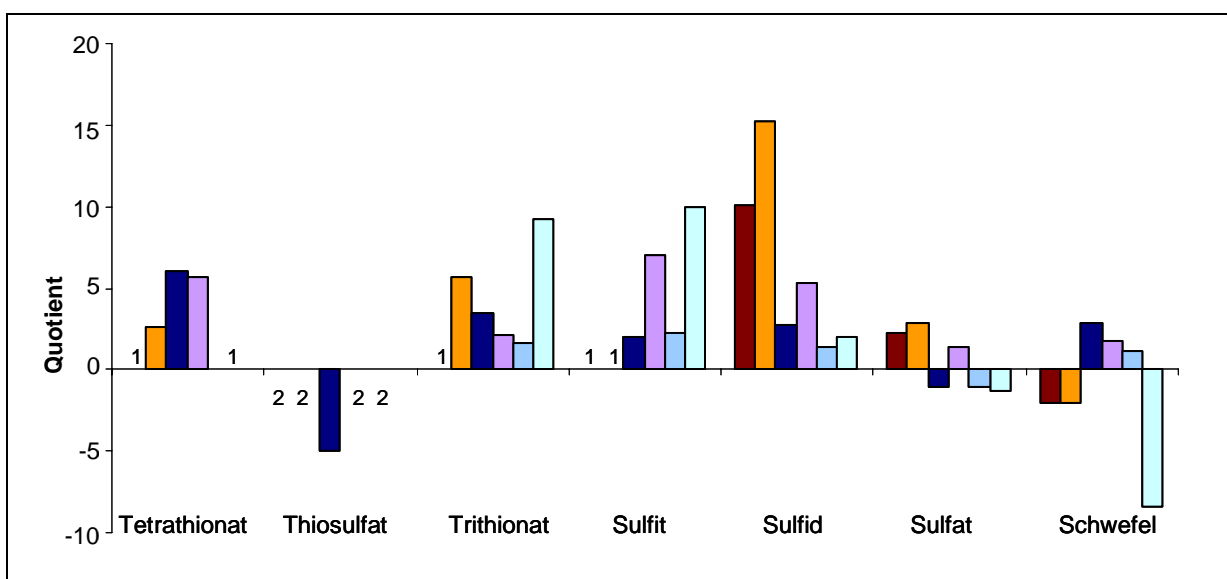


Abbildung 22: Quotient aus den GHB-Werten der Zeitpunkte 0 h und 72 h bei Inkubation von Kultur und Mediumskontrollen mit Schwefel.

1 & 2 = Werte wegen Teilung durch Null nicht darstellbar; es entsteht eine unendliche Zu- (1), bzw. Abnahme (2); ■ = Kulturüberstand, ■ = Kultur (Kulturüberstand plus Zellen), ■ = Mediumskontrolle pH 2,5, ■ = Mediumskontrolle pH 2,0, ■ = Mediumskontrolle pH 1,5, ■ = Mediumskontrolle pH 1,0.

Bei der Dünnschichtchromatographie wurden die zell- und schwefelfreien Kulturüberstände und die schwefelfreie Mediumskontrolle aufgetragen und als Vergleichslösungen 100 mM Kaliumtetrathionat und 100 mM Natriumthiosulfat (Abb.23).

Auf der Dünnschichtchromatographieplatte zeigten sich unter UV-Licht-Betrachtung mehrere Banden. Bei der anschließenden Palladiumchloridfärbung waren jedoch keine Banden zu detektieren (Abb.23).

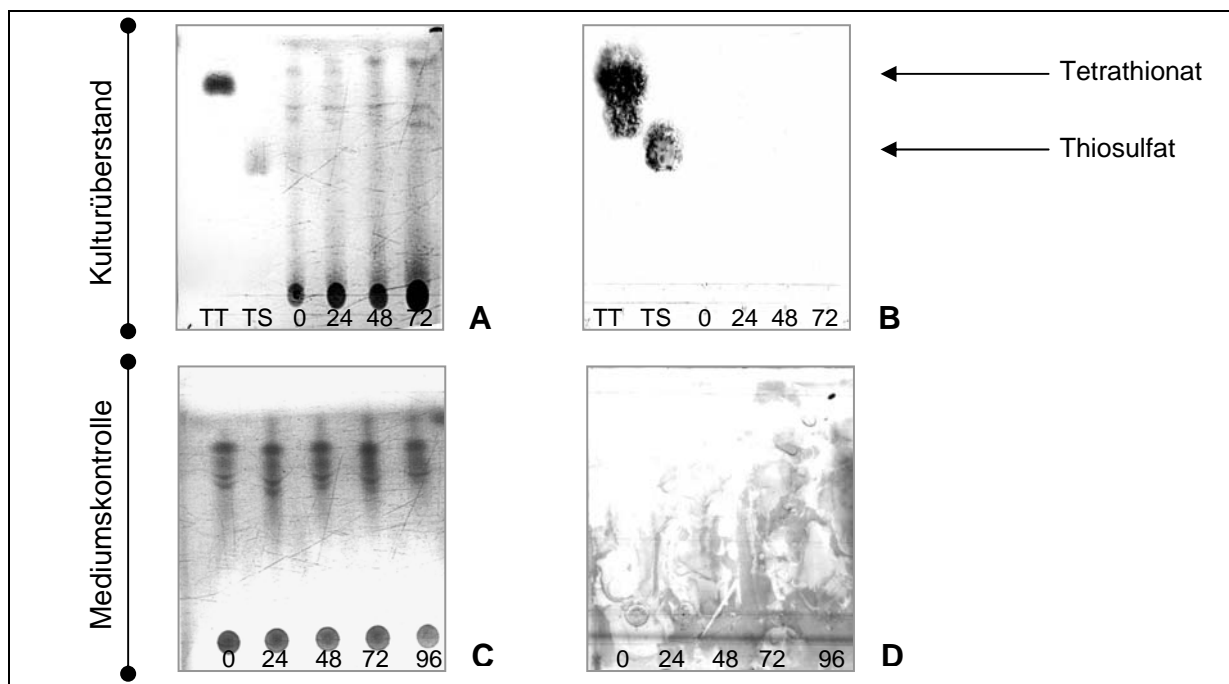


Abbildung 23: DC der Mediumskontrolle und Kulturüberstände nach Inkubation bzw. Wachstum mit Schwefel.

A = Kulturüberstand, unter UV-Licht, B = Kulturüberstand, gefärbt mit PdCl_2 , C = Mediumskontrolle, unter UV-Licht, D = Mediumskontrolle, gefärbt mit PdCl_2 , TT = 0,1 M Kaliumtetrathionat, TS = 0,1 M Natriumthiosulfat, 0 = Entnahme nach 0 h, 24 = Entnahme nach 24 h, 48 = Entnahme nach 48 h, 72 = Entnahme nach 72 h, 96 = Entnahme nach 96 h.

Die Banden der Mediumskontrolle waren stärker als die des Kulturüberstandes gefärbt. Dies kann auf die Zentrifugation des Kulturüberstandes (zur Entfernung der Zellen) zurückzuführen sein, bei der leicht ausfallende Verbindungen mit entfernt wurden.

1.2.2 Wachstum mit Tetrathionat

Es ist bekannt, dass verschiedene Arten der früheren Gattung *Thiobacillus* mit Tetrathionat wachsen können (siehe Einleitung Tab.2). Weiterhin sind verschiedene phototrophe Bakterien der Gattung *Chlorobium* (Friedrich, 1998; Kusai & Yamanaka, 1973a, 1973b; Shahak *et al.*, 1992) sowie Organismen der Gattungen *Pseudomonas* (Whited & Tuttle, 1983) und *Xanthobacter* (Friedrich & Mitrenga, 1981; Wiegel *et al.*, 1978) in der Lage, mit Tetrathionat zu wachsen (siehe auch Einleitung Tabelle 2). Bei den Archaea ist bis jetzt nur *Acidianus brierleyi* dafür bekannt, dass es mit Tetrathionat wächst (Emmel, *et al.*, 1986; Friedrich *et al.*, 1998). Bei *Acidianus ambivalens* war bislang kein Stoffwechselweg bekannt, welcher Tetrathionat als Schwefelquelle verwendet. Die Wachstumsanalysen (siehe 1.1) zeigten jedoch eindeutig, dass *Acidianus ambivalens* auch mit Tetrathionat wachsen kann. Die colorimetrischen Gehaltsbestimmungen wurden wieder mit zellfreien Kulturüberständen durchgeführt (Abb.24).

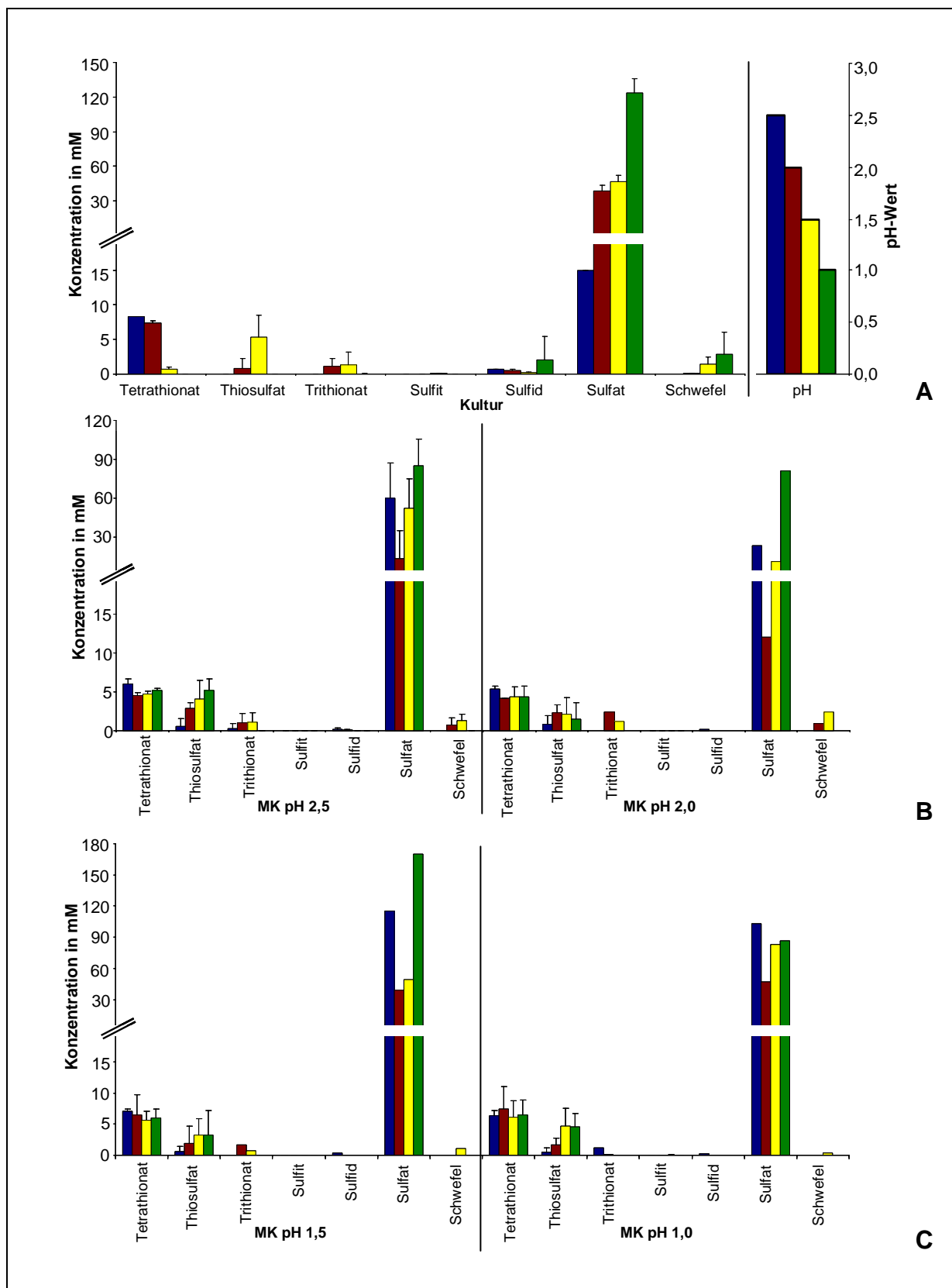


Abbildung 24: Analysen von Schwefel und ASV im Überstand von *Acidianus*-Kulturen und in Mediumskontrollen, bei Inkubation mit Tetrathionat.

Die Kulturen wurden mit 10 mM Tetrathionat bei 80° C angezogen, die Mediumskontrollen wurden ebenfalls mit 10 mM Tetrathionat unter denselben Bedingungen inkubiert. Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = GHB des Kulturüberstands (links) & Messung des pH-Wertes über die Zeit (rechts), B = GHB des Mediums mit den pH-Werten 2,5 (links) und 2,0 (rechts), C = GHB des Mediums mit den pH-Werten 1,5 (links) und 1,0 (rechts).

In den Kulturüberständen war eindeutig eine Abnahme von Tetrathionat zu vermerken, welche in den Mediumskontrollen nicht vorkam (Abb.24 & Abb.25).

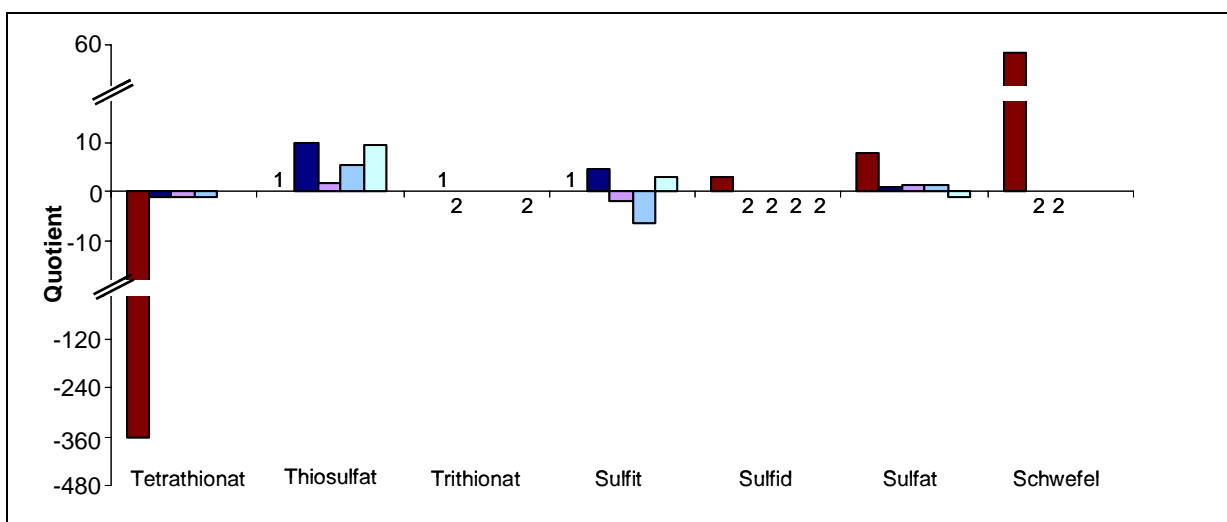


Abbildung 25: Quotient aus den GHB-Werten der Zeitpunkte 0 h und 72 h bei Inkubation von Kultur und Mediumskontrollen mit Tetrathionat.

1 & 2 = Werte wegen Teilung durch Null nicht darstellbar; es entsteht eine unendliche Zu- (1), bzw. Abnahme (2); ■ = Kulturüberstand, ■ = Mediumskontrolle pH 2,5, ■ = Mediumskontrolle pH 2,0, ■ = Mediumskontrolle pH 1,5, ■ = Mediumskontrolle pH 1,0.

Des Weiteren zeigten sich sowohl im Kulturüberstand als auch in den Mediumskontrollen erhöhte Thiosulfat und Trithionat-Konzentrationen (Abb.24). Im Kulturüberstand nahm die Thiosulfat-Konzentration im Verlauf der Kultivierung jedoch wieder ab, im Gegensatz zu den Mediumskontrollen. Die Sulfid- sowie Sulfatkonzentration nahmen im Kulturüberstand über die Zeit zu. Weiterhin war eine Zunahme der Schwefelkonzentration zu verzeichnen (Abb.25). Diese Zunahme der Schwefelkonzentration war in einigen Kulturen auch qualitativ zu beobachten (Abb.26). Dabei produzierten die Kulturen 0,0019 g Schwefel pro ml Kultur. Die Mediumskontrolle wies hingegen keinen sichtbaren Schwefel auf.

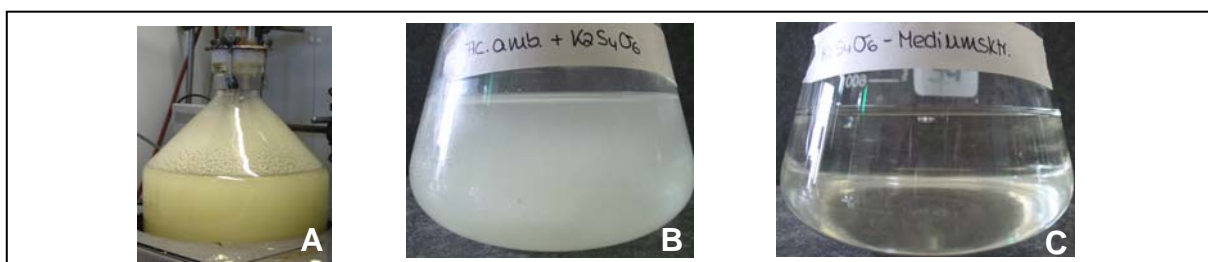


Abbildung 26: Fotos von mit Tetrathionat angezogenen *Acidianus* Kulturen (A & B) im Vergleich zur entsprechenden Mediumskontrolle (C) nach 96 h Inkubation bei 80° C.

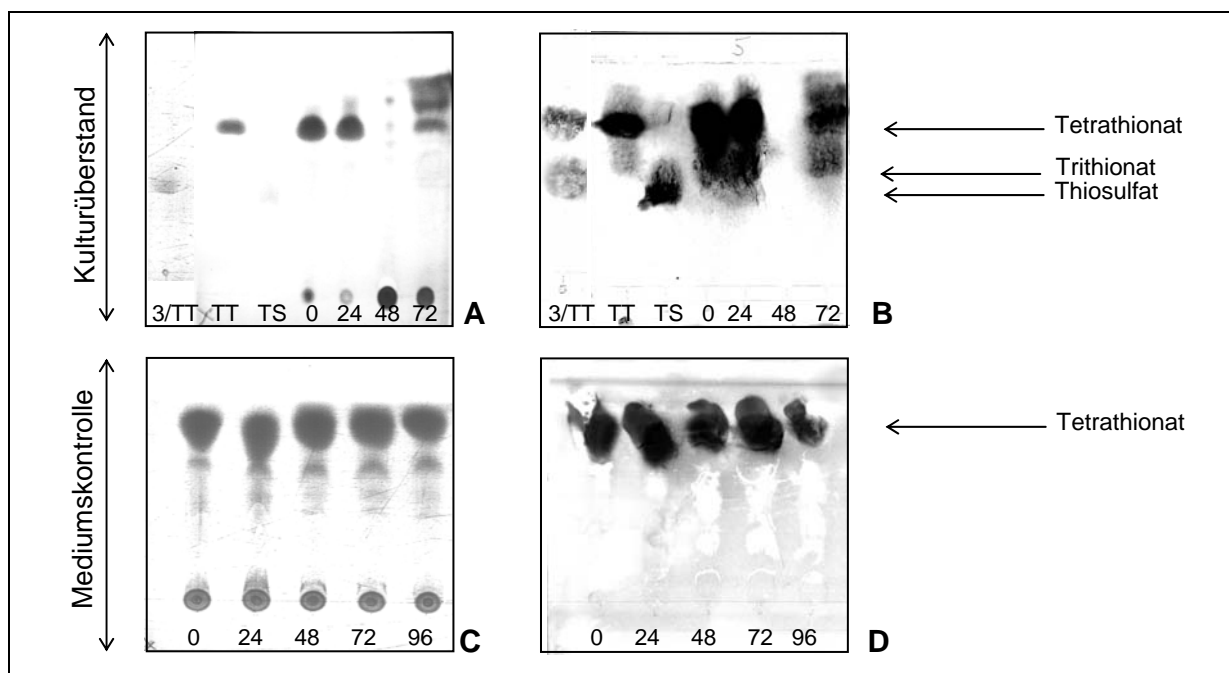


Abbildung 27: Dünnschichtchromatographie der Mediumskontrolle und Kulturüberstände nach Inkubation bzw. Wachstum mit Tetrathionat.

A = Kulturüberstand, unter UV-Licht, B = Kulturüberstand, gefärbt mit Palladiumchlorid, C = Mediumskontrolle, unter UV-Licht, D = Mediumskontrolle, gefärbt mit Palladiumchlorid, 3/TT = Gemisch aus 6,7 mM Trithionat und 10,4 mM Tetrathionat, TT = 0,1 M Kaliumtetrathionat, TS = 0,1 M Natriumthiosulfat, 0 = Entnahme nach 0 h, 24 = Entnahme nach 24 h, 48 = Entnahme nach 48 h, 72 = Entnahme nach 72 h, 96 = Entnahme nach 96 h.

Unter UV-Licht und mit PdCl₂ waren sowohl in der Mediumskontrolle als auch im Kulturüberstand die Tetrathionat-Banden zum Zeitpunkt 0 h zu erkennen. In der Mediumskontrolle blieb diese Tetrathionat-Konzentration auch in den später (24 – 96 h) entnommenen Proben erhalten. Im Kulturüberstand hingegen war nur bis zum Zeitpunkt 24 h eine Tetrathionat-Bande zu erkennen. Im Kulturüberstand trat, im Gegensatz zur Mediumskontrolle, zu den Zeitpunkten 0 – 24 h eine weitere Bande auf, bei der es sich um Trithionat handelt. Nach 48 h waren im Kulturüberstand keine Schwefelverbindungen mehr detektierbar. Nach 72 h ließen sich jedoch erneut Banden mit PdCl₂ anfärben, bei welchen es sich weder um Tetrathionat noch um Thiosulfat oder Trithionat handelt, da diese Banden wie auf der Dünnschichtchromatographieplatte unter UV-Licht zu sehen war, eindeutig oberhalb der Tetrathionat-Bande lagen (Abb.27A).

1.2.3 Wachstum mit verschiedenen Tetrathionat-Konzentrationen

Da die Zellen trotz Zugabe von 10 mM Kaliumtetrathionat (empfohlene Zugabe laut Literatur für *Acidithiobacillus caldus* 5 mM [Hallberg et al., 1996, Hallberg & Lindström, 1994,

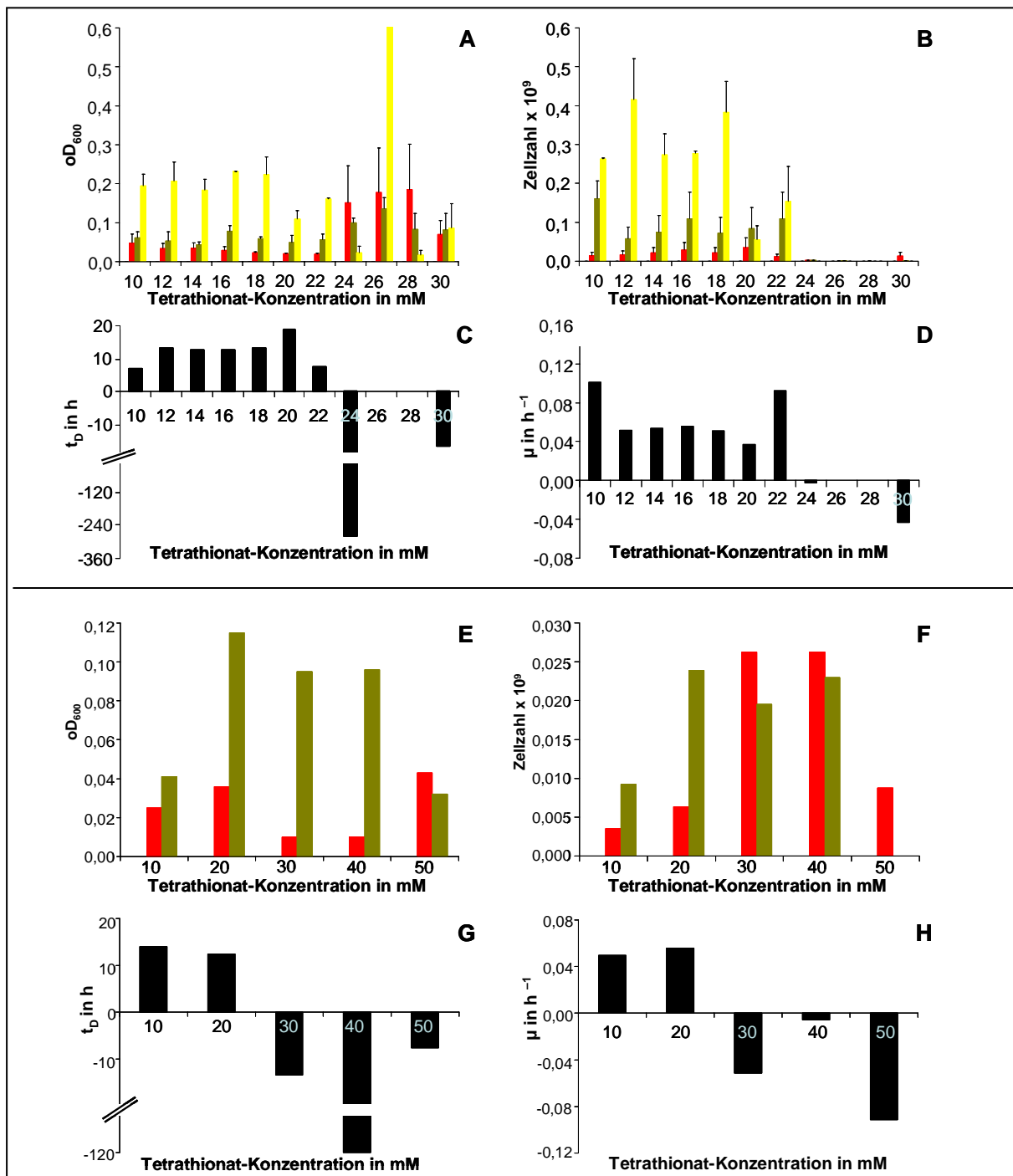


Abbildung 28: Wachstum von *Acidianus* bei Anzucht mit verschiedenen Tetrathionat-Konzentrationen.

Messung nach: ■ 0 h, ■ 24 h, ■ 48 h, ■ 72 h; ■ 24 – 48 h;

A – D = an S° adaptierte Kultur: A = Messung der oD₆₀₀, B = Bestimmung der Zellzahl, C = Verdopplungszeit t_D (24 – 48 h), D = Wachstumskonstante μ (24 – 48 h);

E – H = an S₄O₆²⁻ adaptierte Kultur: E = Messung von oD₆₀₀; F = Bestimmung der Zellzahl; G = Verdopplungszeit t_D (24 – 48 h), H = Wachstumskonstante μ (24 – 48 h).

Dopson, *et al.*, 2002] und für *A. ferrooxidans* 5 – 10 mM [Eccleston *et al.*, 1978]) dieses schnell, d.h. innerhalb von 48 h verbrauchten (Abb. 28), sollte durch Zugabe höherer Tetrathionat-Konzentrationen versucht werden, die Wachstumsphase der Kulturen zu verlängern, um höhere Zellzahlen zu erreichen.

Die Kulturen mit 10 mM Tetrathionat wuchsen wie unter 1.1 beschrieben an. Die Kulturen mit 20 mM Tetrathionat zeigten gegenüber den Kulturen mit 10 mM Tetrathionat leicht erhöhte Zelldichten (Abb.28). Wachstumsunterschiede machten sich auch bemerkbar, je nachdem ob die Zellen, welche zum Animpfen genommen wurden, vorher an Tetrathionat oder Schwefel adaptiert waren. Kulturen, die mit Tetrathionat-adaptierten Zellen angeimpft wurden (Abb.28C), zeigten bei höheren Tetrathionat-Konzentrationen (über 20 mM) höhere Zelldichten als die Vergleichskulturen mit Schwefel-adaptierten Zellen (Abb.28A).

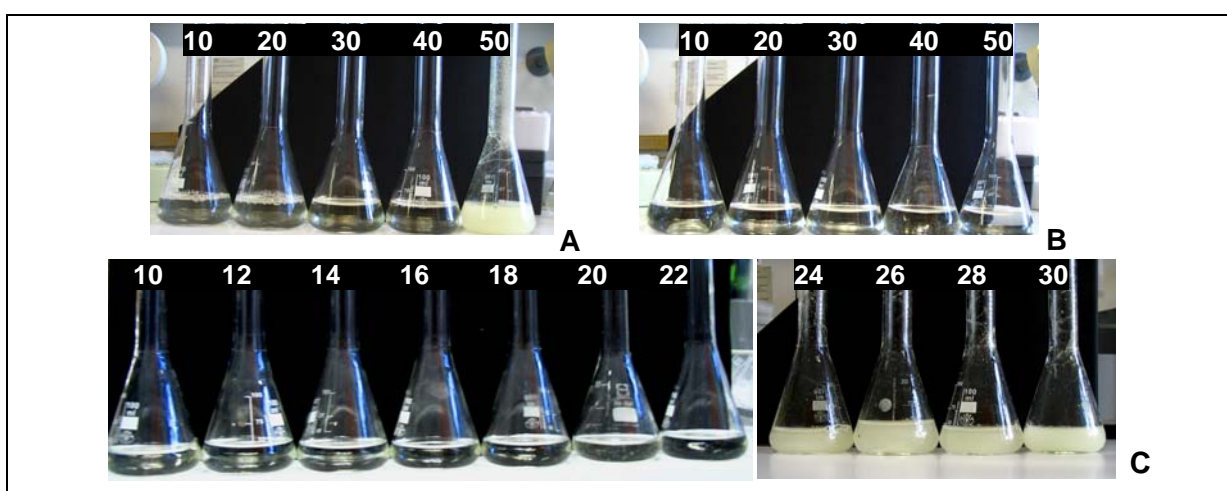


Abbildung 29: Fotos der Tetrathionat-Kulturen nach 72 h.

Ziffern = Tetrathionat-Konzentration in mM, A = Tetrathionat-adaptierte Zellen (siehe auch Abb.28C), B = Mediumskontrollen, C = Schwefel-adaptierte Zellen (siehe auch Abb.28A).

Bei den Mediumskontrollen kam es bei keiner der untersuchten Tetrathionat-Konzentrationen (10 – 50 mM) zu einer Schwefelproduktion (Abb.29B). Bei den Kulturen hingegen zeigten Zellen, die an Tetrathionat adaptiert waren, eine sichtbare Schwefelproduktion ab einer Tetrathionat-Konzentration von 50 mM (Abb.29A). Waren die Zellen hingegen an Schwefel adaptiert, kam es schon ab einer Konzentration von 24 mM zu einer sichtbaren Schwefelproduktion (Abb.29C). Die Schwefelproduktion war somit abhängig von der Adaptation der Zellen an Schwefel.

Weiterhin wurden auch mit β -Alanin pH-stabilisierte Kulturen untersucht. Bei den colorimetrischen Gehaltsbestimmungen (Abb.30) traten mit Zunahme der Tetrathionat-Konzentration Schwefelverbindungen wie Sulfid, Sulfit und Trithionat in höheren Konzentrationen, sowohl im Kulturüberstand, als auch in den entsprechenden Mediumskontrollen auf. Die Zugabe von β -Alanin hatte dabei keinen Effekt auf Schwefelproduktion oder die Konzentration von Schwefelverbindungen.

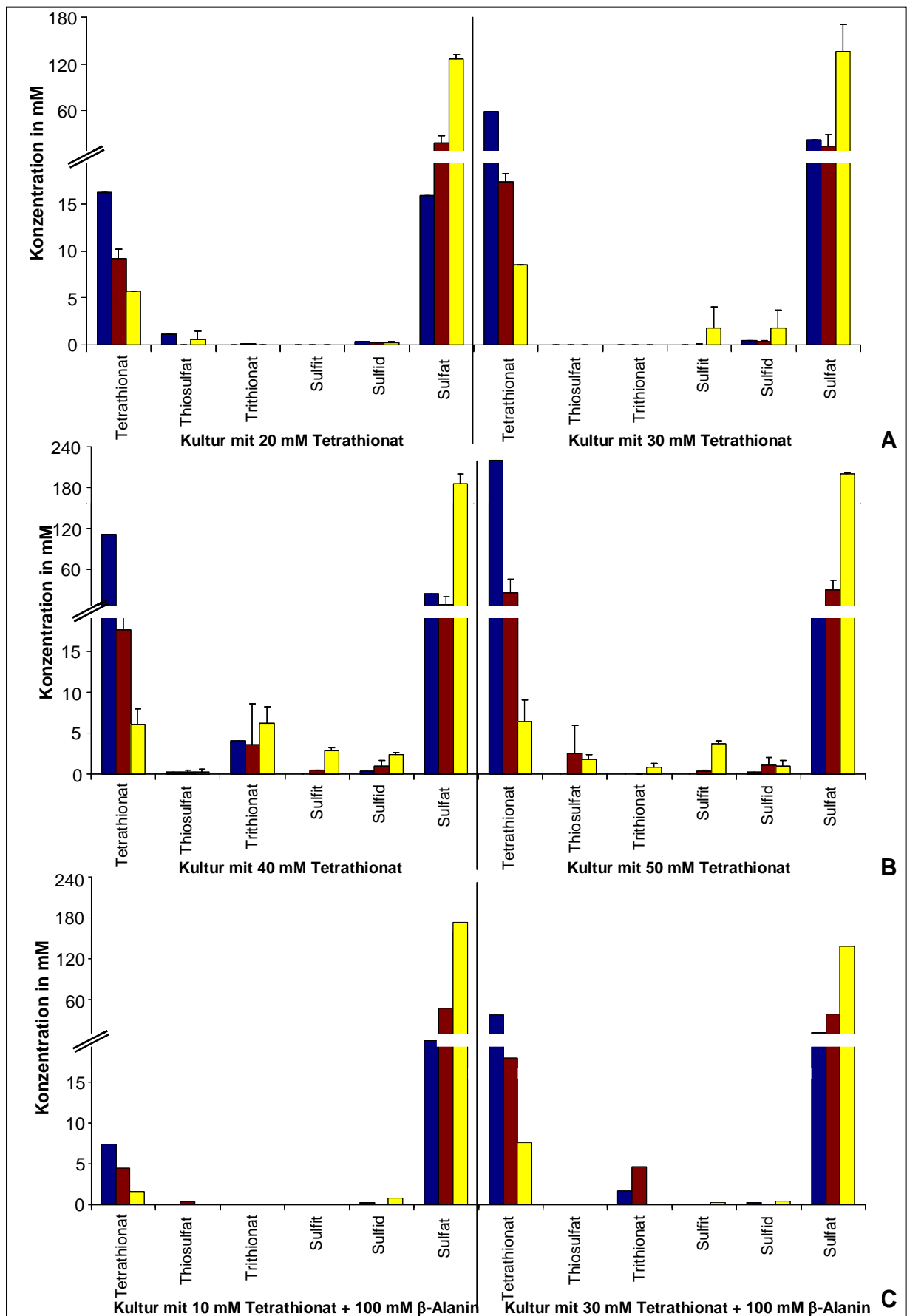


Abbildung 30: Analysen von ASV im Überstand von *Acidianus*-Kulturen bei Inkubation mit verschiedenen hohen Tetrathionat-Konzentrationen.

Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = mit 20 mM (links) & 30 mM Tetrathionat (rechts), B = mit 40 mM (links) & 50 mM Tetrathionat (rechts), C = mit 10 mM Tetrathionat und 100 mM β -Alanin (links) & mit 30 mM Tetrathionat und 100 mM β -Alanin (rechts).

1.2.4 Wachstum mit Tetrathionat und Schwefel

Die Kulturen wurden von Beginn an mit 1% Schwefel und 10 mM Tetrathionat angezogen.

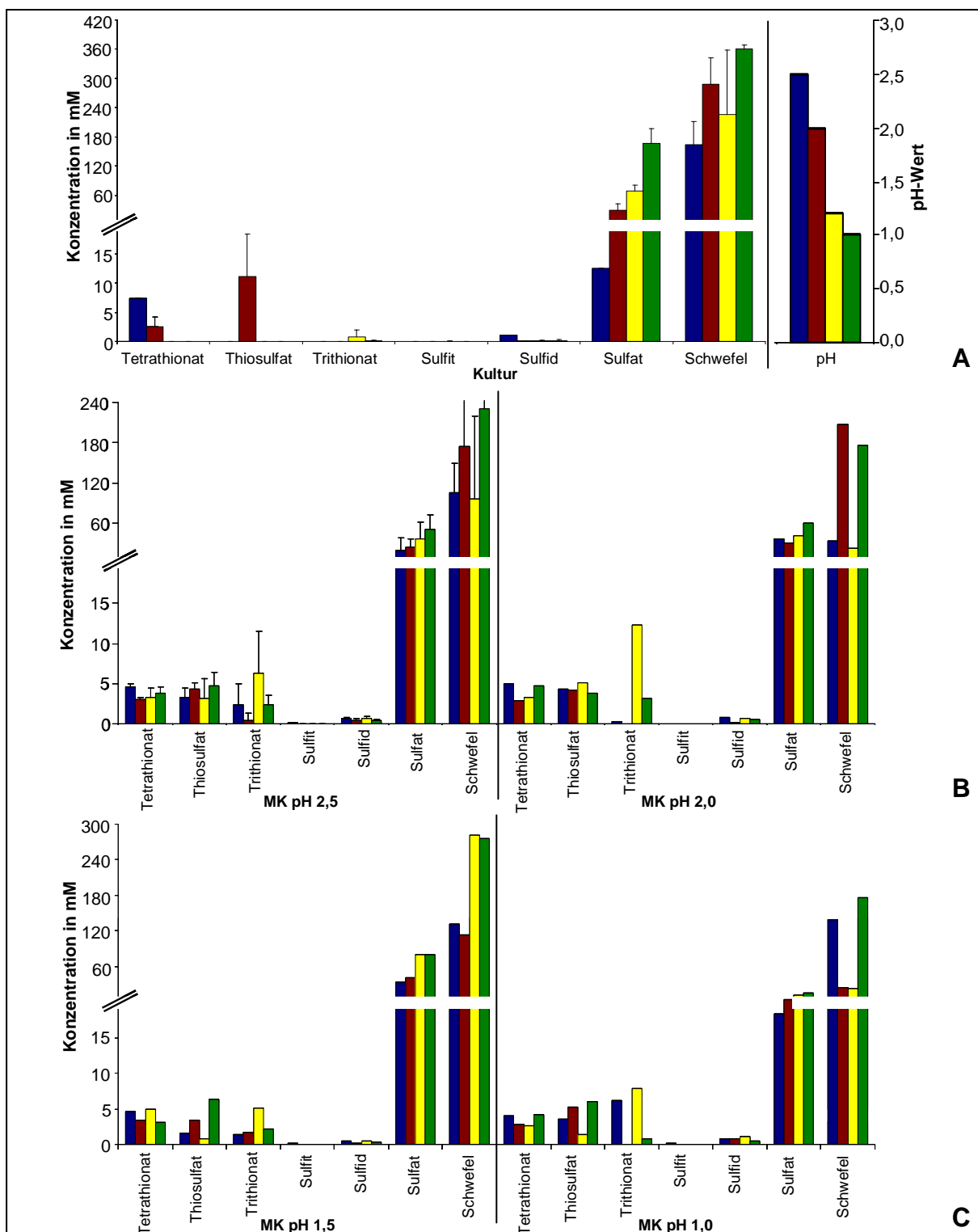


Abbildung 31: Analysen von Schwefel und ASV im Überstand von *Acidianus*-Kulturen und in Mediumskontrollen, bei Inkubation mit Tetrathionat und Schwefel.

Die Kulturen wurden mit 1% Schwefel und 10 mM Tetrathionat bei 80° C angezogen, die Mediumskontrollen wurden ebenfalls mit 1% Schwefel und 10 mM Tetrathionat unter denselben Bedingungen inkubiert. Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = GHB des Kulturüberstands (links) & Messung des pH-Wertes über die Zeit (rechts), B = GHB des Mediums mit den pH-Werten 2,5 (links) und 2,0 (rechts), C = GHB des Mediums mit den pH-Werten 1,5 (links) und 1,0 (rechts).

Die Konzentrationsbestimmungen zeigten einen Verbrauch von Tetrathionat und Schwefel sowie eine Akkumulation von Sulfat an (Abb.31). Weiterhin war ein zeitweiser Anstieg von Thiosulfat zu erkennen.

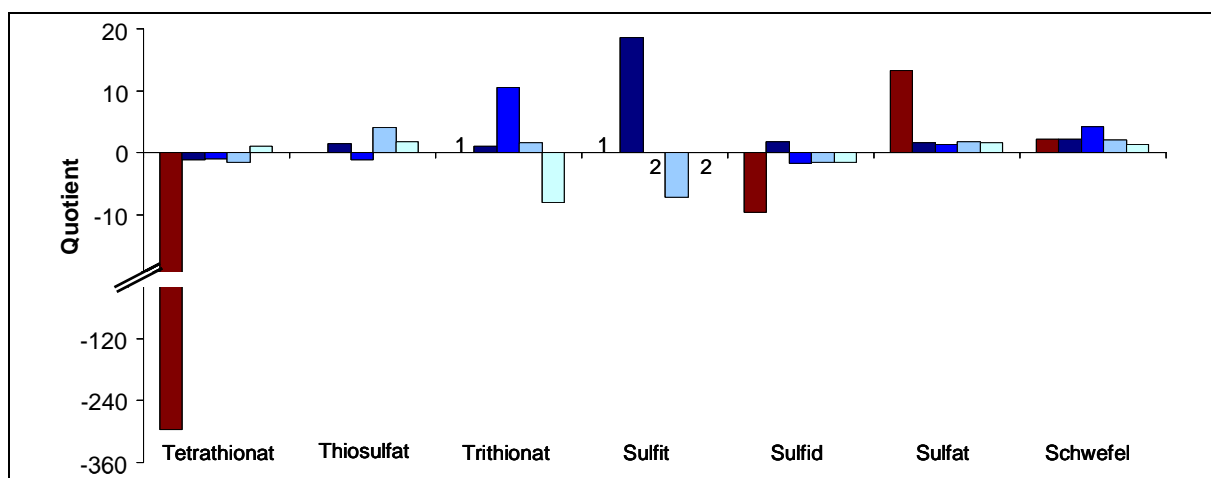


Abbildung 32: Quotient aus den GHB-Werten zum Zeitpunkt 0 h und 72 h bei Inkubation mit Schwefel und Tetrathionat.

1 & 2 = Werte wegen Teilung durch Null nicht darstellbar; es entsteht eine unendliche Zu- (1), bzw. Abnahme (2); ■ = Kulturüberstand, ■ = Mediumskontrolle pH 2,5, ■ = Mediumskontrolle pH 2,0, ■ = Mediumskontrolle pH 1,5, ■ = Mediumskontrolle pH 1,0.

Die Quotienten der GHB-Werte von 0 und 72 h zeigten einen Verbrauch in der Kultur von Tetrathionat an, der in den Mediumskontrollen nicht vorkam. Weiterhin war eine Sulfatakkumulation durch die Kultur zu verzeichnen (Abb.32).

Die Dünnschichtchromatographie zeigte nach PdCl_2 -Färbung der Platte bei den 0 und 24 h Werten eine Tetrathionat-Bande, die beim 48 h & 72 h Wert nicht mehr nachweisbar waren (Abb.33). Des Weiteren waren bei 0 und 24 h Banden zu erkennen, bei denen es sich um Trithionat handelt. Ab dem 48 h Wert waren mit PdCl_2 keine Schwefelverbindungen mehr detektierbar.

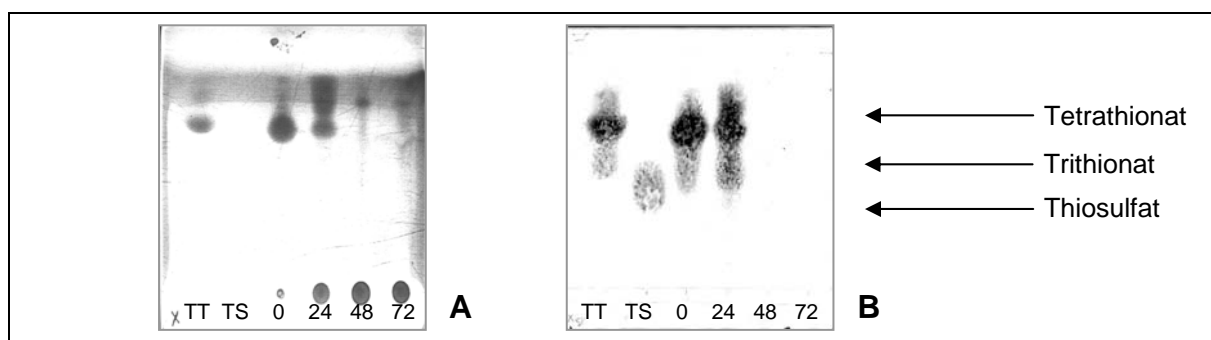


Abbildung 33: DC der Kulturüberstände mit Schwefel und Tetrathionat. A = unter UV-Licht, B = gefärbt mit PdCl_2 ,

TT = 0,1 M Kaliumtetrathionat, TS = 0,1 M Natriumthiosulfat, 0 = Entnahme nach 0 h, 24 = Entnahme nach 24 h, 48 = Entnahme nach 48 h, 72 = Entnahme nach 72 h.

Weiterhin wurden Kulturen untersucht, die bis 48 h nur mit Tetrathionat wuchsen und dann zusätzlich 1% Schwefel bekamen. Die Gehaltsbestimmungen zeigten neben einem Verbrauch von Tetrathionat eine Akkumulation von Sulfid sowie eine zeitweise Anhäufung von Thiosulfat und Trithionat an (Abb.34).

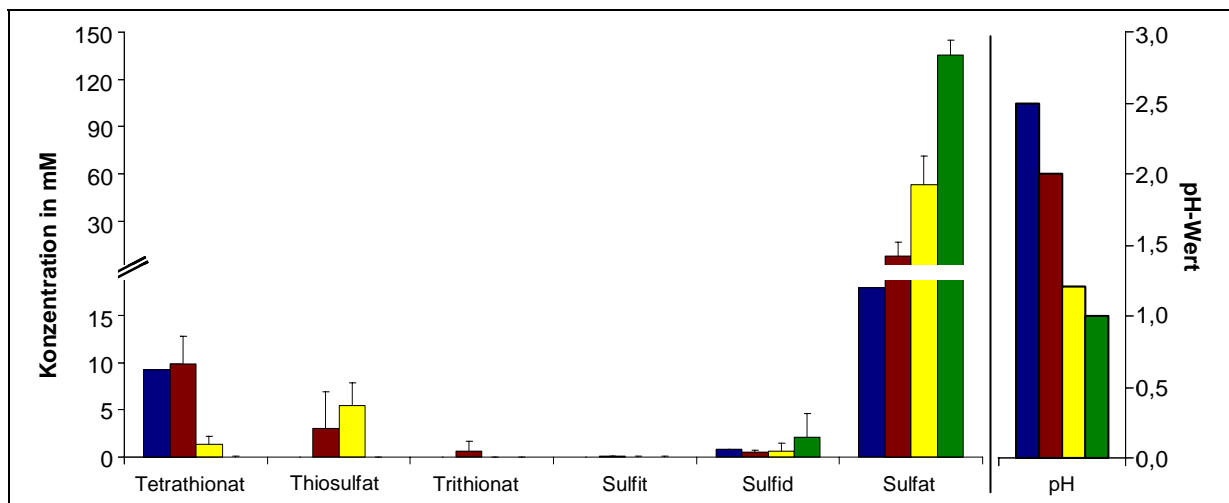


Abbildung 34: Analysen von Schwefel und ASV im Überstand von *Acidianus*-Kulturen bei Inkubation mit zunächst nur Tetrathionat und späterer Zugabe von Schwefel.

Die Kulturen wurden mit zunächst nur mit 10 mM Tetrathionat bei 80° C angezogen. Nach 48 h wurde 1% Schwefel zugegeben. Die Mediumskontrollen entsprachen in ihren Werten denen der Inkubation mit Schwefel und Tetrathionat (Abb.31). A. Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = GHB des Kulturüberstands (links) & Messung des pH-Wertes über die Zeit (rechts).

Bei der Dünnschichtchromatographie waren bei den Proben nach 0 und 24 h stark gefärbte Tetrathionat-Banden zu erkennen sowie schwach gefärbte Trithionat-Banden, welche nur noch mit PdCl_2 nachzuweisen waren (Abb.35). Nach 48 h waren mit PdCl_2 keine Schwefelverbindungen mehr detektierbar. Nach 72 h ließen sich mehrere Banden mit PdCl_2 anfärben, bei denen es sich weder um Tetrathionat, noch um Thiosulfat handelte, da sie bei der Dünnschichtchromatographie über diesen Banden lagen (Abb.35A).

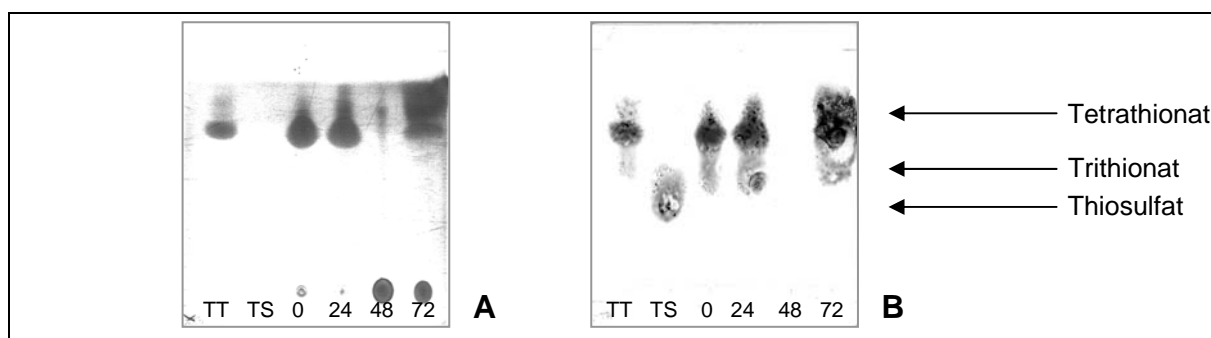


Abbildung 35: DC der Kulturüberstände bei Zugabe von zunächst nur Tetrathionat und späterer Zugabe von Schwefel. A = unter UV-Licht, B = gefärbt mit PdCl_2 , TT = 0,1 M Kaliumtetrathionat, TS = 0,1 M Natriumthiosulfat, 0 = Entnahme nach 0 h, 24 = Entnahme nach 24 h, 48 = Entnahme nach 48 h, 72 = Entnahme nach 72 h.

1.2.5 Wachstum mit Thiosulfat oder ohne verwertbare Schwefelverbindungen

Die Kulturen mit Thiosulfat als Schwefelquelle zeigten ebenso wie die Kulturen ohne

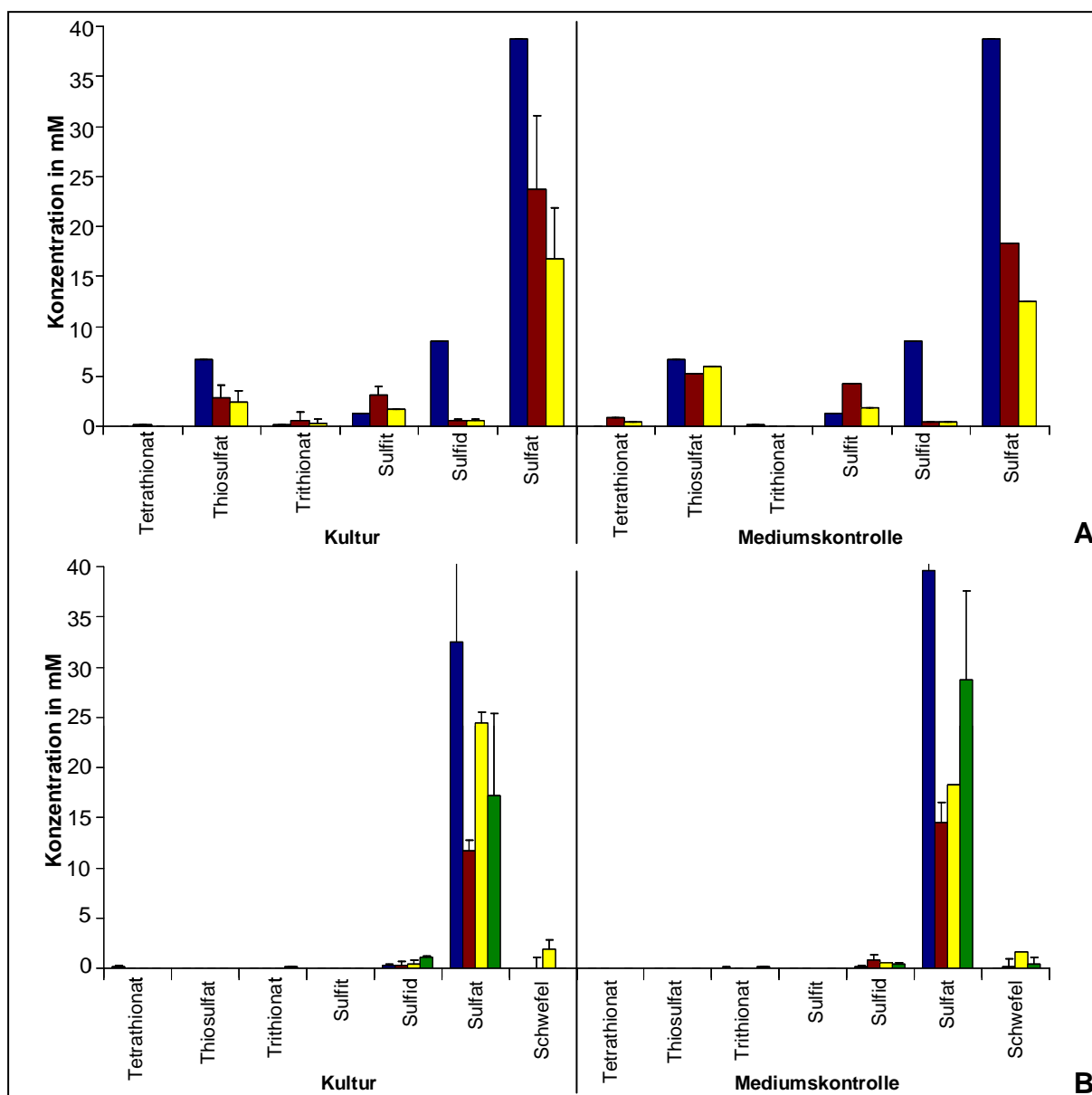


Abbildung 36 Analysen von ASV im *Acidianus*-Kulturüberstand und in Mediumskontrollen, bei Inkubation mit Thiosulfat (A) oder ohne verwertbare Schwefelverbindungen (B). Messung nach: ■ = 0 h, ■ = 24 h, ■ = 48 h, ■ = 72 h; A = GHB des Kulturüberstands (links) & der Mediumskontrolle (rechts) bei Inkubation mit 10 mM Thiosulfat, B = GHB des Kulturüberstands (links) & der Mediumskontrolle (rechts) bei Inkubation im Medium ohne verwertbare Schwefelverbindungen.

verwertbare Schwefelverbindungen nur in den ersten 24 h ein minimales Wachstum, was auf Schwefelreserven der Kryokonserven zurückzuführen war (siehe Abb.16).

Im Kulturüberstand und der Mediumskontrolle nach Inkubation ohne verwertbare Schwefelverbindungen war ein Hintergrund von Schwefel und Sulfid messbar. Andere Verbindungen wurden nicht gemessen. Bei Inkubation mit Thiosulfat zeigte die Thiosulfat-Gehaltsbestimmung beim Kulturüberstand eine Abnahme des Thiosulfates um 85,2%, in der

Mediumskontrolle hingegen nur um 33,8%. Thiosulfat ist unter den gegebenen Bedingungen (80° C, pH 2,5) nicht stabil, sondern zerfällt zu Schwefel und Sulfid. Diese Spontanreaktion konnte sowohl in den bei 80° C inkubierten Mediumskontrollen als auch in den Kulturen beobachtet werden (Abb.37).

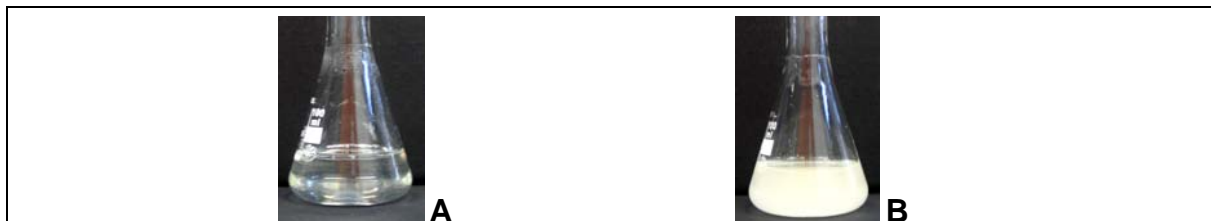


Abbildung 37: Fotos der Mediumskontrolle vor (A) und nach Inkubation (B) mit 10 mM Thiosulfat bei 80° C.

1.3 Wachstum von *Acidianus ambivalens* im Dialyseschlauch

Um festzustellen, ob *Acidianus* an den Schwefel binden muss, um ihn zu verwerten, sollten die Zellen in einem Dialyseschlauch, getrennt vom Schwefel, angezogen werden.

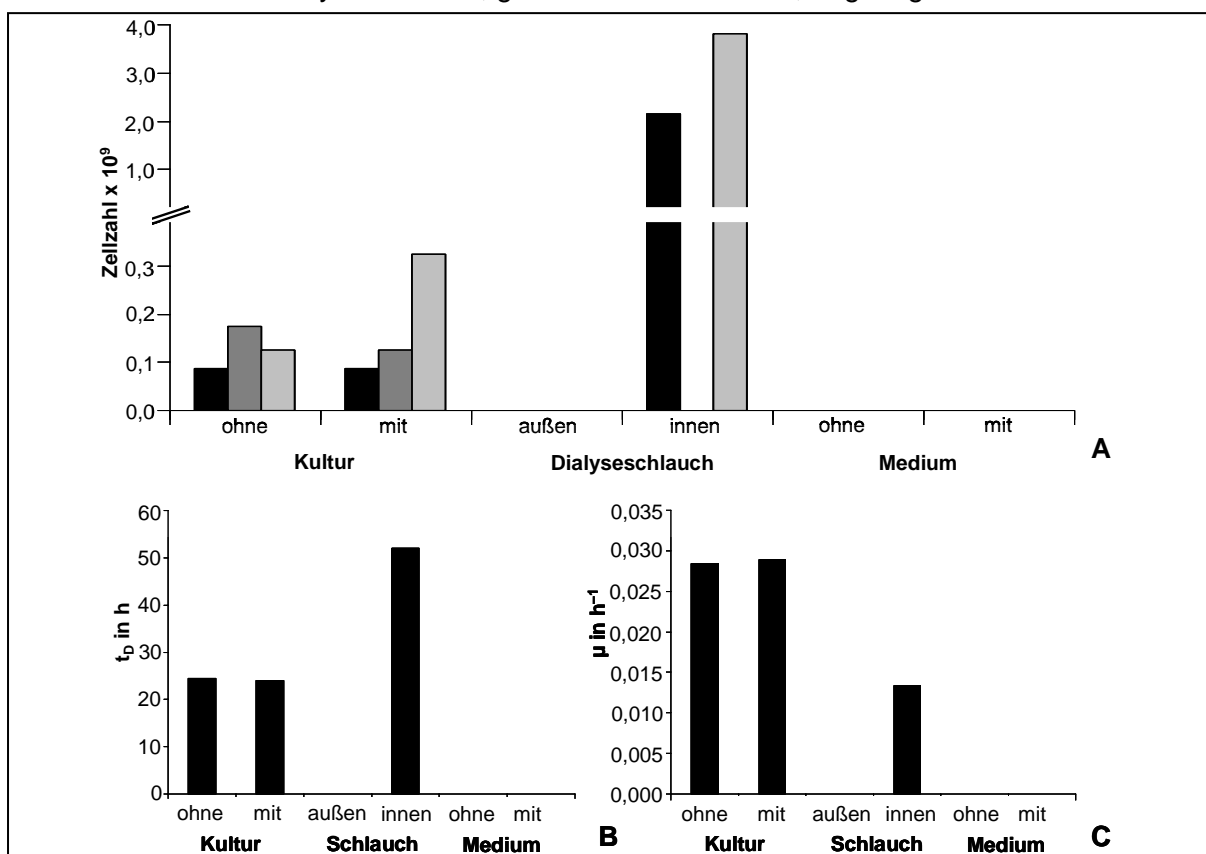


Abbildung 38: Analyse des Wachstum von *Acidianus*-Kulturen im Dialyseschlauch und Vergleichskulturen.

A = Zellzahl, B = Verdopplungszeit t_D , C = Wachstumsrate μ ;

Kultur = Zellen, die normal im Kolben angezogen wurden; (Dialyse-) Schlauch = die Zellen wurden im Schlauch angezogen, das Medium im Kolben enthielt keine Zellen; Medium = Mediumskontrolle, ohne Zellen; ohne = ohne Dialyseschlauch; mit = mit einem offenen Stück Dialyseschlauch; außen = Medium außerhalb des Schlauchs; innen = Zellsuspension im Schlauch

Zur Überprüfung, ob die Zellen im Dialyseschlauch gewachsen waren und ob der Dialyseschlauch die Zellen wirksam von Schwefel trennt, wurde das Wachstum der Kulturen im Dialyseschlauch und im Kulturüberstand außerhalb des geschlossenen Dialyseschlauchs überprüft (Abb.38). Dabei zeigte sich eine Erhöhung der Zellzahl in 48 h um das 1,78-fache. Außerhalb des geschlossenen Dialyseschlauchs im Kulturüberstand waren keine Zellen zu detektieren. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die normal im Kolben angezogen wurden. Zur Kontrolle, ob der Dialyseschlauch sich störend auf das Zellwachstum auswirkt wurden Zellen im Kolben mit einem Stück offenen Dialyseschlauch angezogen. Dabei verlief das Wachstum der Zellen im Kolben mit und ohne offenen Dialyseschlauch annähernd gleich. Der Dialyseschlauch wirkte sich somit nicht schädlich auf das Wachstum der Zellen aus. Als Negativkontrollen wurde Medium mit und ohne ein Stück Dialyseschlauch inkubiert. In den Mediumskontrollen waren, wie erwartet keine Zellen vorhanden.

2 Das Schwefel-Binde-Protein (SBP)

Um festzustellen, ob Proteine an der Schwefelmobilisierung des aeroben Schwefelmetabolismus beteiligt sind, wurden Kulturüberstand und Schwefel nach Kulturwachstum untersucht. Als Kontrolle dienten Kulturüberstand und Schwefel beim anaeroben Wachstum mit Schwefel, bei dem der Schwefelumsatz membrangebunden durch die Schwefelreduktase katalysiert wird. Weiterhin wurden Schwefel und Kulturüberstand des neu entdeckten Tetrathionat-Stoffwechsels analysiert. Um Verunreinigungen des Schwefels auszuschließen, wurde dieser ebenfalls verwendet. Des Weiteren wurde das Schwefelsediment von *Sulfurisphaera* MC1 untersucht.

2.1 Proteine des Kulturüberstandes

2.1.1 Proteinisolierung

Im original Kulturüberstand konnten mittels SDS-PAGE keine Proteine detektiert werden. Deshalb wurde der Kulturüberstand aufkonzentriert. Dafür wurde zunächst eine TCA-Fällung durchgeführt, anschließend das Sediment resuspendiert und durch Nanosep-10- oder Cetricon-3-Säulen weiter eingengt. Die Konzentrate wurden anschließend durch SDS-PAGE überprüft (Abb.39). Aus 320 ml Kulturüberstand war eine einzelne Proteinbande von 18 kDa Masse durch Silberfärbung detektierbar (Abb.39; Tasche 320).

Bei dem Konzentrat von 4,52 l fiel ein rötliches Sediment aus. Das Sediment und der aufkonzentrierte Überstand wurden getrennt und mittels SDS-PAGE untersucht (Abb.39, Taschen Ü4 & P4). Während auf dem Gel beim Überstand eine 30 kDa-Bande zu erkennen war, sah man beim Sediment eine 66 kDa Bande.

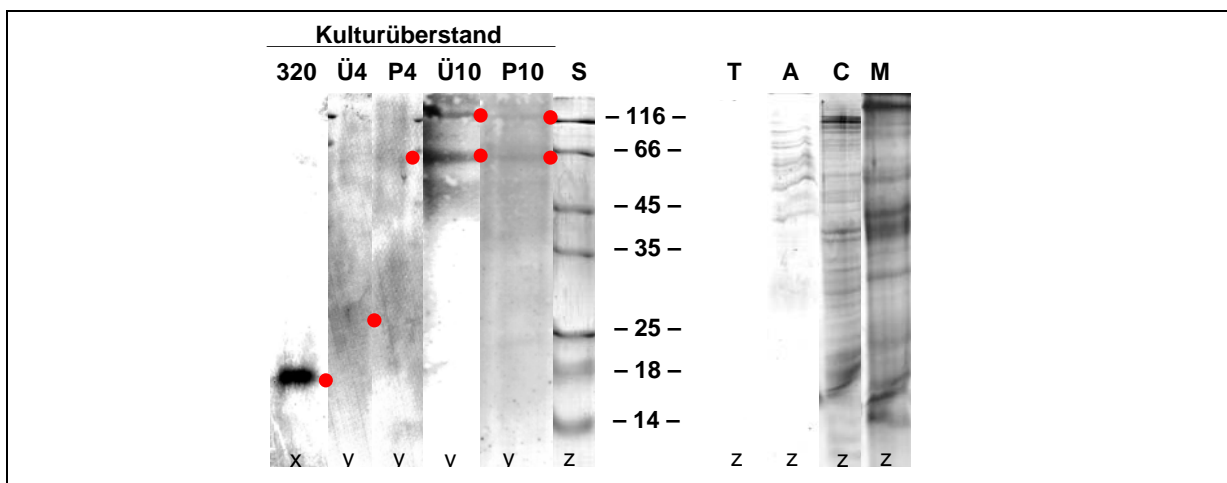


Abbildung 39: Polyacrylamidgele & PVDF-Membranen mit Proteinen aus dem Kulturüberstand. Die Punkte geben die Lage der gefundenen Proteine an. x = Polyacrylamidgel nach Silberfärbung, y = PVDF-Membran nach Coomassie-Färbung, z = Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, S = Massenstandard #SM0431 in kDa, 320 = Konzentrat aus 320 ml, Ü4 = lösliche Fraktion aus 4,52 l, P4 = Sediment aus 4,52 l, Ü10 = lösliche Fraktion aus 10,1 l, P10 = Sediment aus 10,1 l, T = Konzentrat aus 5 l nach aeroben Wachstum mit Tetrathionat, A = Konzentrat aus 5 l nach anaeroben Wachstum mit S⁰, C = cytoplasmatische Proteine aus *Acidianus* nach aeroben Wachstum mit S⁰, M = Membransolubilisat aus *Acidianus* nach aeroben Wachstum mit S⁰.

Bei der Aufkonzentrierung von 10,1 l fiel ebenfalls ein Sediment aus, so dass auch hier eine Fraktionierung in Sediment und Überstand vorgenommen wurde. Auf dem Polyacrylamidgel sah man bei beiden Fraktionen eine Bande von 66 kDa sowie 116 kDa Masse (Abb.39, Taschen P10 & Ü10). Bei den anderen Banden handelte es sich hingegen um Zellhintergrund.

Die Aufkonzentrierungen der Kulturüberstände nach anaerobem Wachstum mit Schwefel und nach aerobem Wachstum mit Tetrathionat zeigten auf dem Gel keine Bande, bzw. leichten Zellhintergrund (Abb.39, Taschen A und T).

Eine Überprüfung des Proteingehaltes bestätigte, dass in allen untersuchten Kulturüberständen des aeroben Kulturwachstums mit Schwefel nur sehr geringe Proteinmengen vorhanden waren (Tab.13).

Tabelle 13: Proteingehaltsbestimmung der Kulturüberstände.

320 = Konzentrat aus 320 ml, Ü4 = lösliche Fraktion aus 4,52 l, P4 = Sediment aus 4,52 l, Ü10 = lösliche Fraktion aus 10,1 l, P10 = Sediment aus 10,1 l, A = Konzentrat aus 5 l nach anaeroben Wachstum mit Schwefel, T = Konzentrat aus 5 l nach aeroben Wachstum mit Tetrathionat.

Fraktion			Gesamtprotein	
Name	Bemerkung	Volumen in l	Proteinmenge in mg	Größe in kDa*
320	Gesamt	0,32	0,022	18
Ü4	Löslich	4,52	0,071	66
P4	Sediment	4,52	0,106	25
Ü10	Löslich	10,10	5,280	116 / 66
P10	Sediment	10,10	0,210	116 / 66
A	Gesamt	5,00	0,297	Hintergrund
T	Gesamt	5,00	0,000	---

* geschätzte Masse laut Polyacrylamidgel

2.1.2 Verwendung von Säulen

Weiterhin wurde versucht, Proteine durch Bindung an Säulenmaterial zu isolieren. Dazu wurde das Säulenmaterial PAD-1 (Protein-Adsorbens, Serdolit) verwendet, ein Ionenaustauscher, welcher Proteine aller Art binden sollte. Beladen wurden die Säulen mit je 10 l des Kulturüberstandes nach aeroben bzw. anaeroben Wachstum mit Schwefel (AÜ). Die Elution erfolgte in 10 Schritten, mit steigenden Isopropanol- (5 – 90%) und sinkendem Methanolgehalt (50 – 0%).

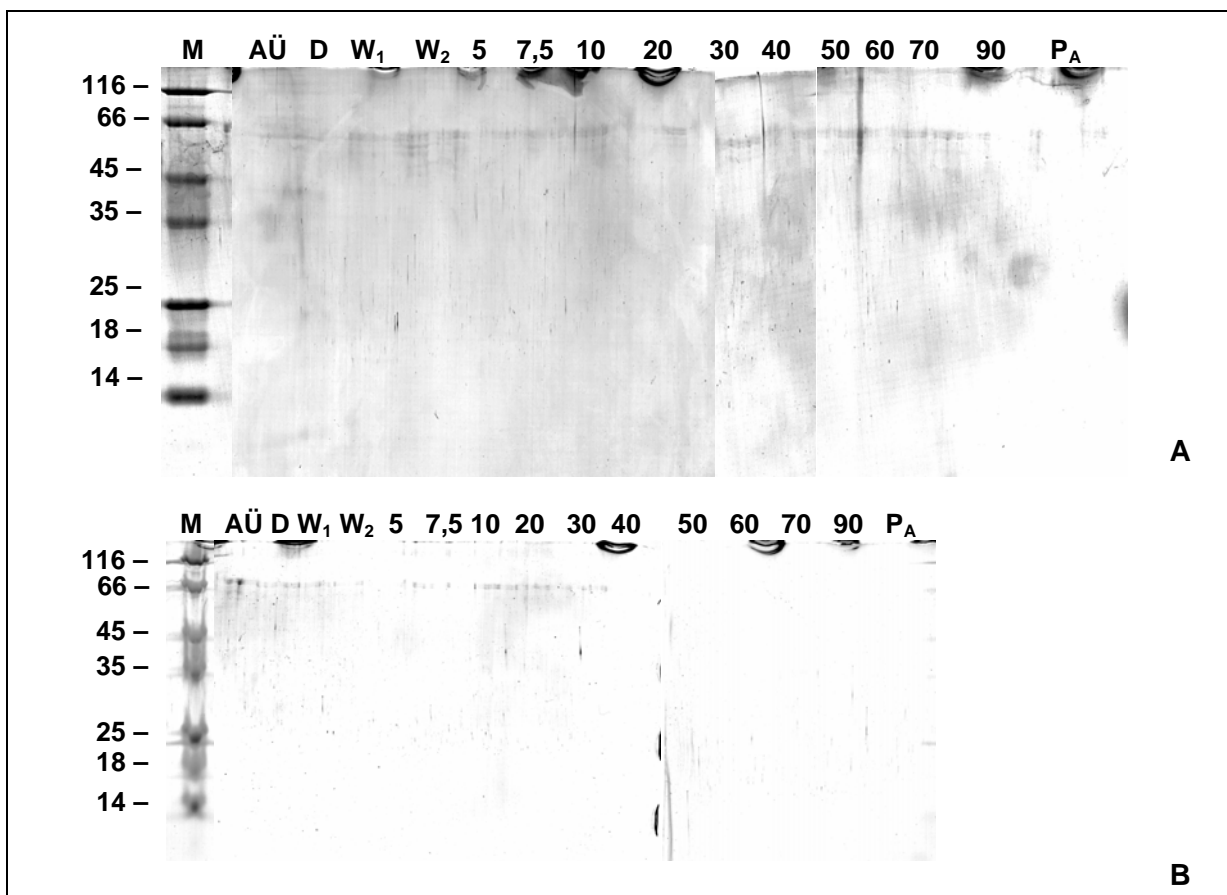


Abbildung 40: Silbergefärbte Polyacrylamidgele der PAD-1-Säulenaufreinigung.

Die Säulen wurden nach Auftrag des Kulturüberstandes (AÜ) zunächst mit Wasser (W_1) und anschließend mit Puffer A (MeOH-Puffer; W_2) gewaschen. Anschließend wurde die Elution mit Gemischen aus Puffer A (MeOH) und Puffer B (Isopropanol-Puffer) durchgeführt, wobei der Isopropanolgehalt kontinuierlich erhöht (5 – 90%) und der MeOH-Gehalt erniedrigt (50 – 0%) wurde. Die Säulen wurden anschließend mit Puffer A (P_A) gewaschen.

A = Säulenaufreinigung mit Kulturüberstand nach aeroben Wachstum mit Schwefel, B = Säulenaufreinigung mit Kulturüberstand nach anaeroben Wachstum mit Schwefel, AÜ = Kulturüberstand vor der Säulenaufreinigung, D = Durchfluss, W_1 = Waschfraktion mit H_2O , W_2 = Waschfraktion mit Puffer A, 5 – 90 = Elutionsfraktionen mit Puffer A-Puffer B-Gemischen (Zahl = Isopropanolgehalt in %), P_A = Waschen der Säule nach der Elution mit Puffer A.

Bei Überprüfung durch SDS-PAGE war in allen Fraktionen neben Zellhintergrund eine 66 kDa-Bande zu erkennen, die sowohl beim Kulturüberstand nach aeroben Wachstum mit Schwefel (Abb.40A) als auch nach anaerobem Wachstum mit Schwefel (Abb.40B) auftrat.

Es wurde weiterhin versucht, Proteine mittels Schwefelsäulen zu isolieren. Dabei sollten Proteine, die an der Schwefelmobilisierung beteiligt sind, an den Schwefel binden.

Dazu wurde zunächst die Säule mit EF-Puffer (8 M Harnstoff) und Wasser gewaschen und anschließend 3 l Kulturüberstand (aerob mit Schwefel) auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit EF-Puffer, so dass die an den Schwefel gebundenen Proteine durch den im Puffer enthaltenen 8 M Harnstoff entfaltet werden und dadurch ihre Bindung zum Schwefel verlieren sollten. Die erhaltenen Fraktionen zeigten deutlich unterschiedliche Färbungen (Abb.41).

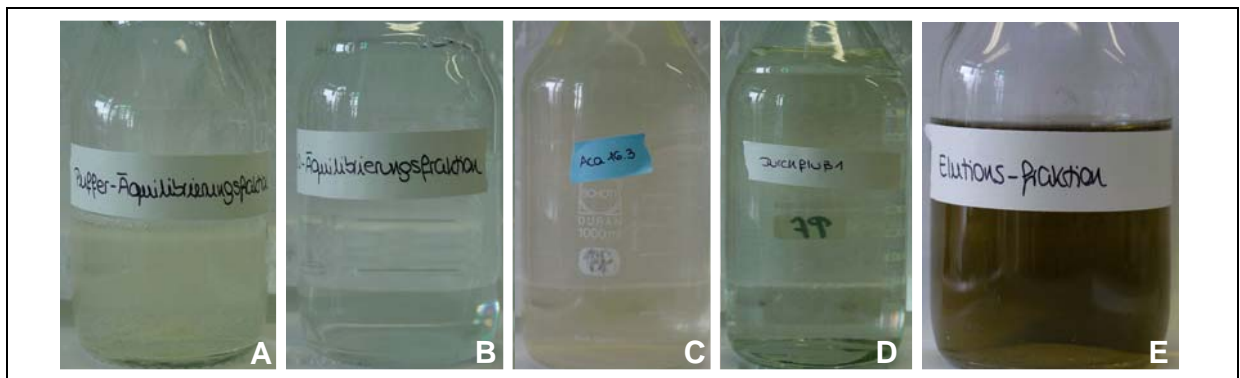


Abbildung 41: Fotos der einzelnen Fraktionen der Schwefelsäule.

A = Äquilibrationsfraktion mit Puffer, B = Äquilibrationsfraktion mit H₂O, C = Kulturüberstand nach aeroben Wachstum mit Schwefel vor der Zugabe zur Säule, D = Durchfluss, E = Elutionsfraktion.

Während der Durchfluss gegenüber dem Kulturüberstand vorher seine Trübung verlor (Abb.41 C & D) zeigte die Elutionsfraktion eine tief-bräunliche Färbung (Abb.41 E). Bei der Äquilibrierung der Säule mit dem gleichen Puffer kam es jedoch nicht zu dieser Färbung (Abb.41 A).

In keiner Fraktion waren bei Überprüfung durch SDS-PAGE Banden auf dem Gel zu erkennen (Abb.42).

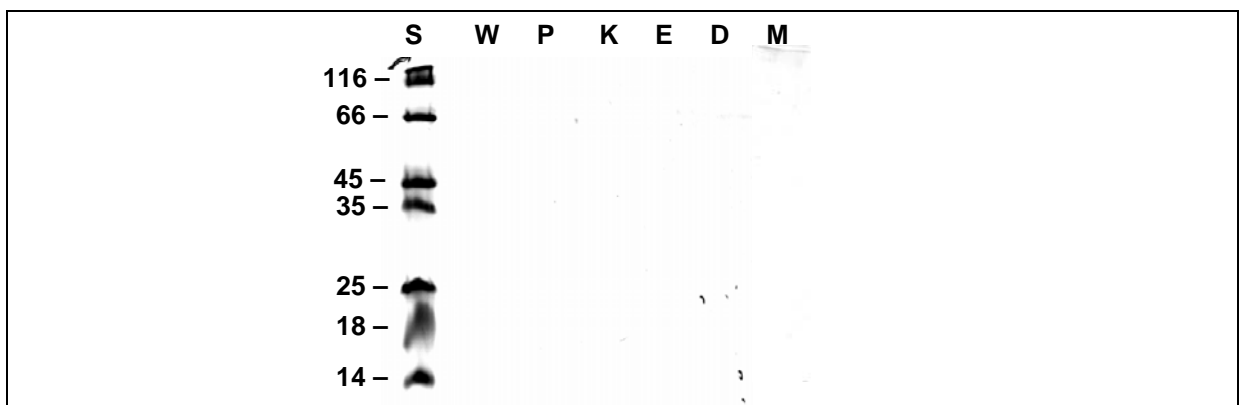


Abbildung 42: Silbergefärbtes PA-Gel der Schwefel-Säulen-Fractionen.

Die aufgetragenen Fraktionen waren alle 250-fach aufkonzentriert, aufgetragen wurden je 20 µl. S = Massenstandard #SM0431 in kDa, W = Äquilibrationsfraktion mit Wasser, P = Äquilibrationsfraktion mit Puffer A, K = Kulturüberstand vorher, E = Eluat, D= Durchfluss, M = Säulenmaterial nach der Säulenaufreinigung.

Um zu überprüfen woher die Färbung der Elutionsfraktion kommt, wurde mit dem Eluat und dem Durchfluss zunächst eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt (Abb.43A & B). Sowohl unter UV-Licht, als auch mit PdCl_2 waren keine Banden zu detektieren.

Eine Aufkonzentrierung von möglichen Schwefelverbindungen erfolgte dann mit dem Schwefelsäuleneluat über zwei verschiedene XAD-Säulen. Säule 1 wurde mit Aceton, Säule 2 mit Methanol behandelt und eine Dünnschichtchromatographie der jeweils erhaltenen Fraktionen durchgeführt. Dabei wurde die Platte zunächst unter UV-Licht betrachtet (Abb.43C) und anschließend mit PdCl_2 gefärbt (Abb.43D).

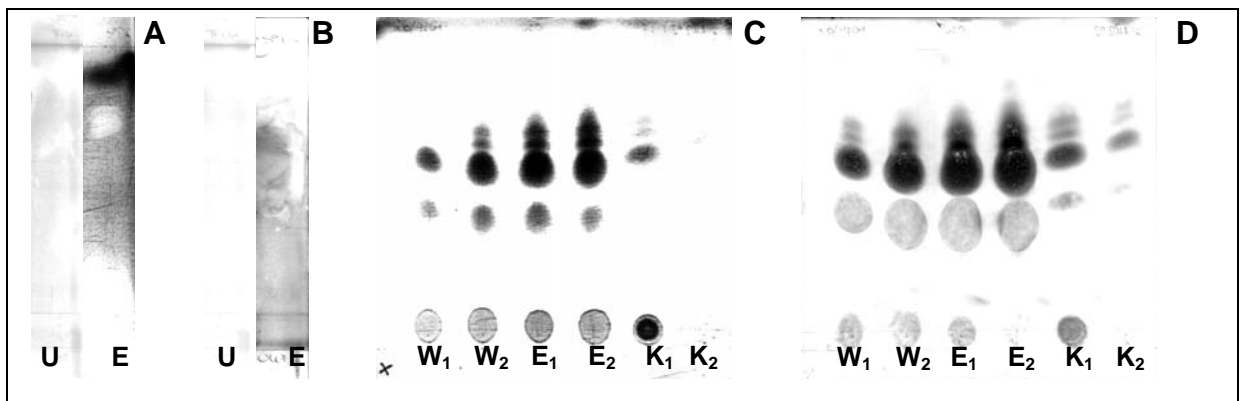


Abbildung 43: Dünnschichtchromatographien mit Eluaten einer Schwefel-Säule.

A & C = unter UV-Licht, B & D = gefärbt mit PdCl_2 , Durchfluss und Eluat der Dünnschichtchromatographie 1 (A & B) sind Originalproben der Schwefelsäulenaufreinigung, bei der Dünnschichtchromatographie 2 sind alle aufgetragenen Proben von der Aufreinigung des Schwefelsäuleneluats über XAD-Säulen. W_1 , E_1 , K_1 = Fraktionen der Säule mit Aceton, W_2 , E_2 , K_2 = Fraktionen der Säule mit Methanol, U = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Eluat, K = Kulturüberstand.

Auf der Dünnschichtchromatographieplatte der XAD-Fractionen sah man verschiedene Banden, die sowohl unter UV-Licht, als auch mit PdCl_2 -Färbung zu sehen waren (Abb.43). Während im Kulturüberstand (K) diese Banden nur schwach zu erkennen waren, waren sie in der Waschfraktion (W) stärker und im Eluat (E) sehr stark zu sehen. Die detektierten Banden waren jedoch in allen untersuchten Fraktionen dieselben, so dass keine spezifische Bande auf der Dünnschichtchromatographieplatte bei den Eluaten zu sehen waren, auf welche die Färbung zurückzuführen gewesen wäre (Abb.43).

2.2 Schwefelgebundene Proteine

2.2.1 Isolierung des Schwefel-Binde-Proteins (SBP)

Aus dem Schwefelsediment nach aeroben Kulturwachstum von *Acidianus ambivalens* wurde versucht, Proteine zu isolieren, welche an der Schwefelmobilisierung beteiligt sind. Es wurde vermutet, dass diese Proteine zur Mobilisierung des Schwefels an diesen binden müssen. Um die Bindung des Protein an den Schwefel zu lösen, wurde das Schwefel-

sediment mit harnstoffhaltigem Puffer (EF.A) inkubiert, so dass im Schwefel enthaltene Proteine sich entfalten und damit die Bindung zum Schwefel verlieren sollten. Schwefel und Überstand wurden durch Filtration getrennt. Der Schwefel-Überstand (Ü) wurde zunächst durch SDS-PAGE überprüft (Abb.44A). Teilweise wurde der Schwefel vor der Inkubation mit Medium gewaschen, um eine Kontamination mit Zellresten zu minimieren, was aber kaum nötig war (Abb. 44B).

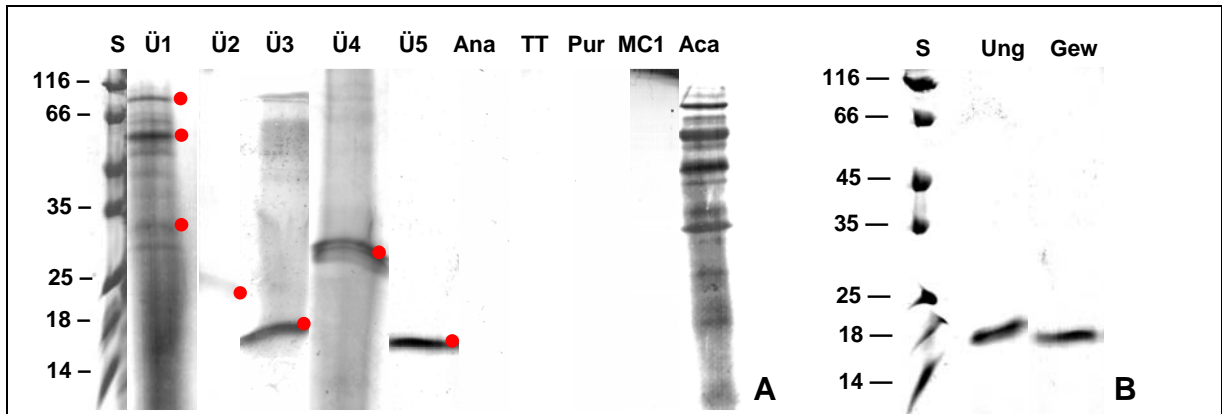


Abbildung 44: Coomassie-gefärbte PA-Gele von filtrierten Überständen nach Inkubation des Schwefelsedimentes mit harnstoffhaltigem Puffer.

Die Punkte geben die Lage der gefundenen Proteine an. S = Massenstandard #SM0431 in kDa;

A = Der Schwefel nach Wachstum der Kulturen wurde zunächst in harnstoffhaltigem Puffer inkubiert und anschließend durch Filtration getrennt. Die hier aufgetragenen Proben sind die erhaltenen Überstände nach dem Filtrationsschritt; 1 – 5 = Aufreinigungs-Nr., Ü = Schwefel-Überstand nach aeroben Wachstum mit Schwefel, Ana = Schwefel-Überstand nach anaeroben Wachstum mit Schwefel, TT = Schwefel-Überstand nach aeroben Wachstum der Kultur mit Tetrathionat, Pur = Schwefel-Überstand des Schwefels ohne Inkubation in *Acidianus*-Medium, MC1 = Schwefel-Überstand von *Sulfurisphaera* MC1, Aca = lösliche Proteinfraction von *Acidianus*;

B = Beim gewaschenen Schwefel wurde der Schwefel vor Inkubation mit Harnstoff-Puffer mit *Acidianus*-Medium gewaschen, beim ungewaschenen Schwefel wurde dieser Schritt weggelassen; Ung = Schwefel-Überstand einer Isolierung aus Schwefel ohne Waschschrift, Gew = Schwefel-Überstand einer Isolierung aus Schwefel mit vorherigem Waschschrift,

Mit Ausnahme der ersten Isolierung (Abb.44, Tasche Ü1), bei der sehr viel Hintergrund von Proteinen aus geplatzten Zellen vorhanden war, wurde jeweils eine einzelnen Proteinbande detektiert, die immer zwischen 18 und 45 kDa lag. Wurden die Proteinlösungen mehrmals mittels SDS-PAGE untersucht, kam es vor, dass sich ihre Masse von SDS-PAGE zu SDS-PAGE änderte. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass es sich bei allen isolierten Proteinen in diesem Massenbereich um das gleiche Protein handelt. Das Protein wurde aufgrund seiner vermuteten Funktion Schwefel-Binde-Protein (SBP) genannt.

Bei allen filtrierten Überständen war eine intensive rötlich-braune Färbung zu erkennen, die in Überständen ohne Protein fehlte (Abb.45). Dabei war die Färbung umso intensiver, je mehr Protein in der Lösung vorhanden war (Vergleiche Abb.45. A – C). Eine Proteingehaltsbestimmung war aufgrund der intensiven Färbung nicht möglich.

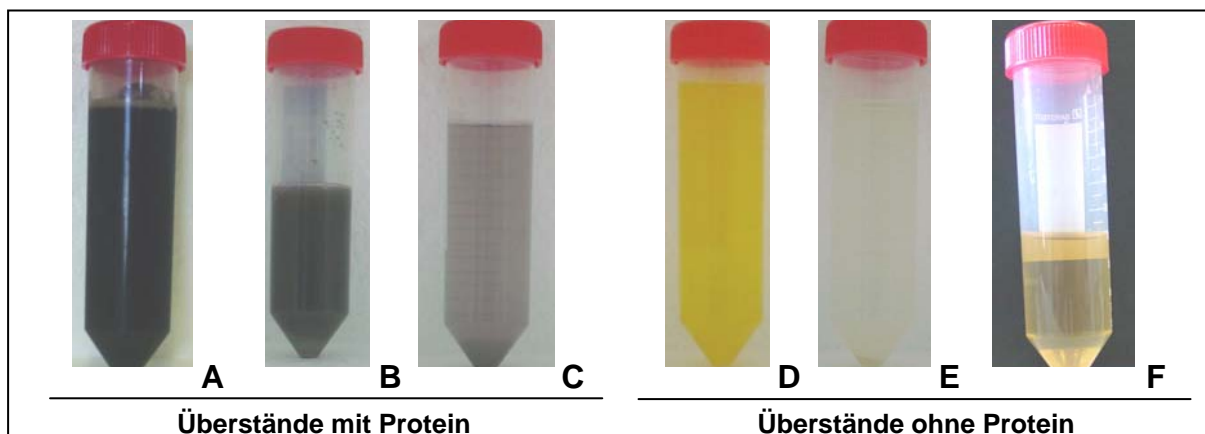


Abbildung 45: Fotos der filtrierten Überstände nach Inkubation des Schwefelsedimentes mit harnstoffhaltigem Puffer.

A = Überstand des Schwefels (150 g) nach aerober Kultivierung mit Schwefel mit sehr viel Protein,
 B = Überstand des Schwefels (50 g) nach aerober Kultivierung mit Schwefel mit viel Protein,
 C = Überstand aus Schwefels (30 g) nach aerober Kultivierung mit Schwefel mit wenig Protein,
 D = Überstand des Schwefels (50 g) aus der Packung, ohne Inkubation bei 80° C, ohne Protein,
 E = Überstand des Schwefels (50 g) nach anaerober Kultivierung mit Schwefel, ohne Protein,
 F = Überstand des Schwefels (50 g) nach Kultivierung von *Sulfurisphaera* MC1, ohne Protein.

2.2.2 Isolierung von SBP aus dem Schwefel mittels Detergenzien

Um eine Entfaltung des Schwefel-Binde-Proteins (SBP), bei Inkubation des Schwefels mit 8 M Harnstoff zu vermeiden, wurde der Harnstoff durch die Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumdesoxycholat (DOC), Octylglycosid (OG), Triton X-100 (T) und Dodecylmaltosid (DM) ersetzt. Die Inkubation von je 30 g Schwefel erfolgte wieder für 1 h bei 60° C, die Trennung von Schwefel und Überstand durch Filtration. Eine Färbung war bei allen Überständen zu erkennen (Abb.46). Am stärksten war die Färbung bei dem Filtrat mit DOC im Puffer, am schwächsten beim Überstand mit Harnstoff. Als Vergleich wurde die cytoplasmatische Proteinfraction von *Acidianus ambivalens* ebenfalls mit Triton X-100 behandelt. Die Überstände wurden durch Chloroform-Methanol-Fällung aufkonzentriert und

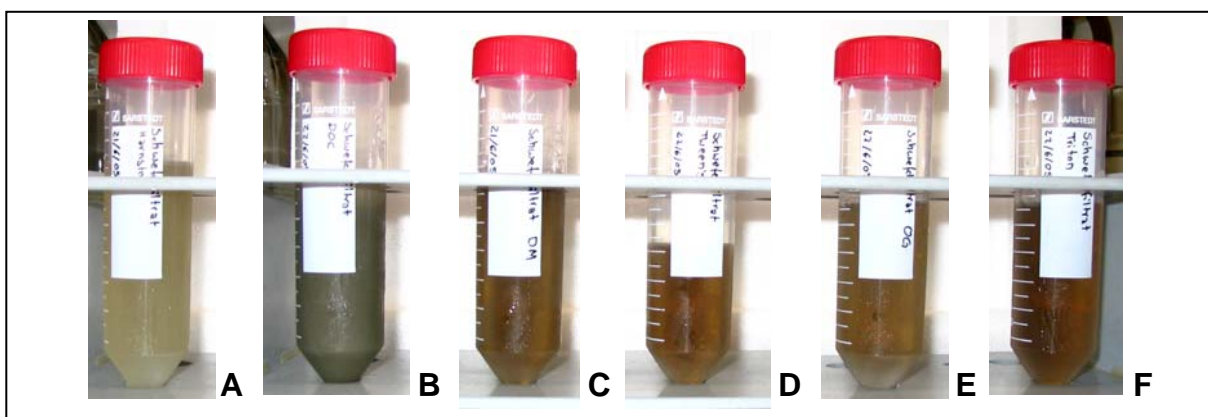


Abbildung 46: Fotos der filtrierten Überstände nach Inkubation von je 30 g Schwefelsediment mit detergentenhaltigen Puffern.

A = mit Harnstoff, B = mit DOC, C = mit DM, D = mit TWEEN-20, E = mit OG, F = mit Triton X-100.

mittels SDS-PAGE untersucht (Abb.47). Dabei zeigte sich, dass das SBP mit Detergenzien besser aus dem Schwefel herausgelöst werden konnte als mit Harnstoff. Bei allen untersuchten Überständen war eine Proteinbande mit einer Masse von 45 – 50 kDa erkennbar (Abb.47A & B). Bei Isolierung mit Triton X-100 war am meisten SBP vorhanden, während bei Isolierung mit TWEEN-20 kaum SBP isoliert werden konnte. Auch hier zeigte das isolierte Protein bei Auftrennung durch SDS-PAGE unterschiedliche Massen. Um festzustellen, ob die Anreicherung eines einzelnen Proteins aus *Acidianus* möglich ist, wurden die Zellen ebenfalls mit Triton X-100 behandelt. Dabei zeigten sich auf dem Gel jedoch mehrere cytoplasmatische und membrangebundene Proteine.

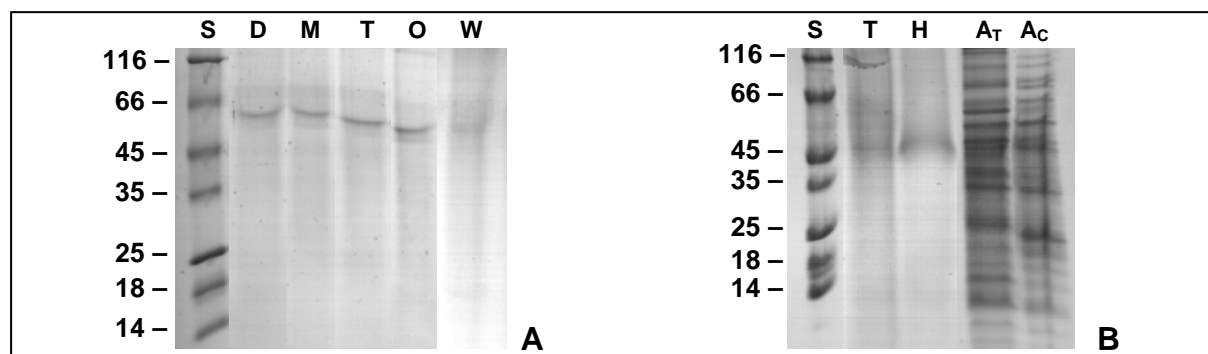


Abbildung 47: Coomassie-gefärbte PA-Gele mit aufgetragenen Proben filtrierter Überstände nach Inkubation des Schwefelsedimentes mit detergenzienhaltigen Puffern. A = Gel der aufkonzentrierten Überstände, B = Vergleich von den Überständen mit Triton X-100 und Harnstoff mit *Acidianus ambivalens* Proteinextrakten; S= Massenstandard in kDa, H = Überstand mit Harnstoff, D = Überstand mit DOC, M = Überstand mit DM, T = Überstand mit Triton X-100, O = Überstand mit OG, W = Überstand mit TWEEN-20, A_T = mit Triton X-100 isolierte Proteinfraction von *Acidianus ambivalens*, A_C = cytoplasmatische Proteinfraction von *Acidianus ambivalens*.

2.2.3 Bestimmung der SBP-Sequenz

Zur Identifizierung wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, ausgeschnitten und MALDI-TOF-Analysen durchgeführt (Abb.48). Alle Proteine der aufgetragenen Proteinlösungen sind aus dem Schwefel nach aerober Kultivierung mit Schwefel isoliert worden.

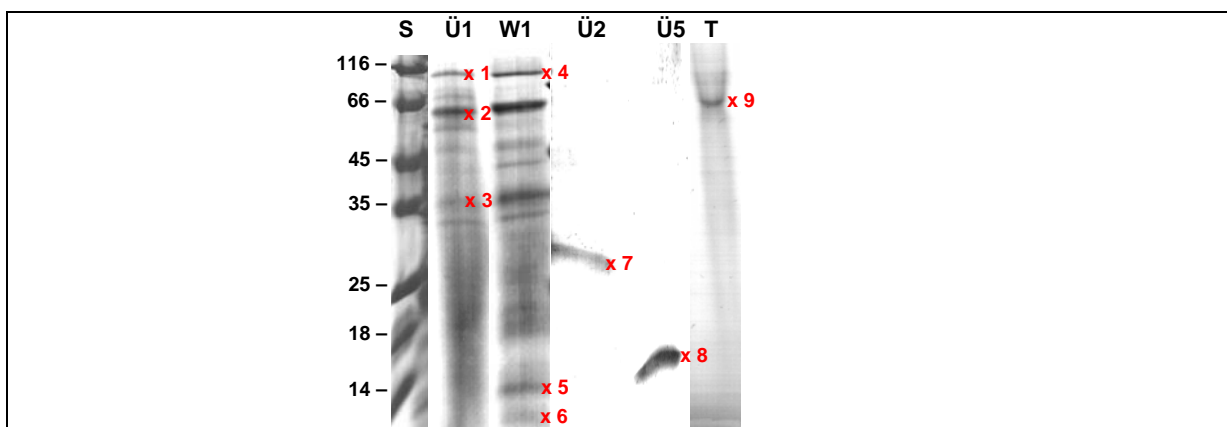


Abbildung 48: PA-Gele für die MALDI-TOF-Analyse.

S= Massenstandard #SM0431 in kDa, Ü1 = Schwefel-Überstand Ü1, W1 = Schwefelwaschfraktion des Schwefelsedimentes Ü1, Ü2 = Schwefel-Überstand Ü2, Ü5 = Schwefel-Überstand Ü5, T = Schwefel-Überstand mit Triton. 1 – 9 = MALDI-TOF-Nr.

Die erhaltenen Spektren sahen viel versprechend aus (Abb.49). Ein Vergleich der erhaltenen Fragmente mit der MS-Fit-Datenbank von *Acidianus ambivalens* war nicht möglich, da die Firma (Esplora, Darmstadt), die teilweise die MALDI-TOF-Analysen durchführte, die MS-Fit-Datenbank zur Identifizierung der Fragmente gelöscht hatte. Ein Vergleich der Fragmente mit der offiziellen Datenbank brachte keine Übereinstimmung. Somit konnten lediglich die erhaltenen Fragmente untereinander verglichen werden (Tab.14). Eine Identifizierung des untersuchten Proteins durch MALDI-TOF war somit nicht möglich.

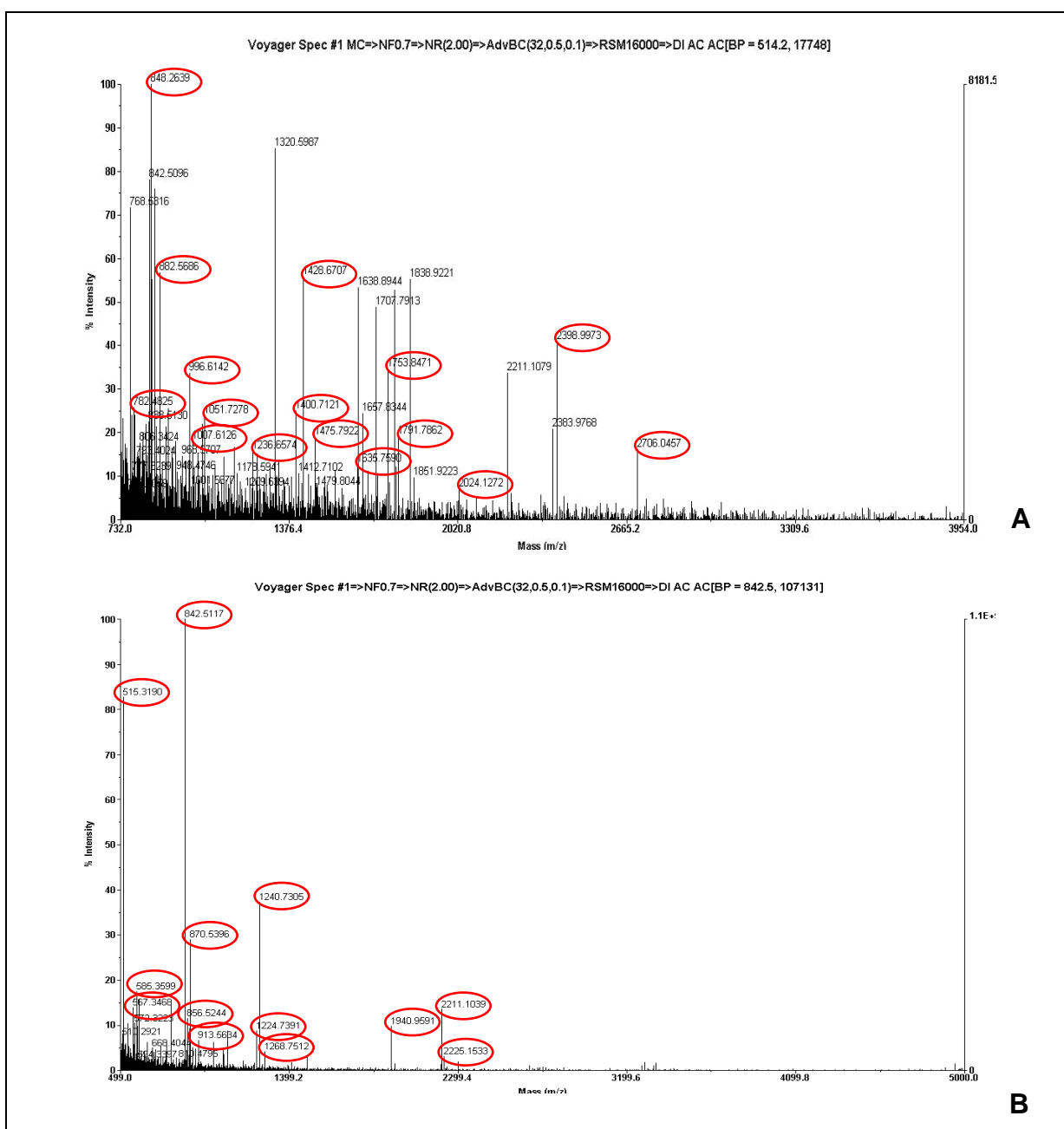


Abbildung 49: MALDI-TOF-Spektren der Analysen 8 (A) und 9 (B).

○ = Peaks, die ausgewertet wurden. Die anderen Peaks waren entweder von der Intensität her zu niedrig oder waren auf Trypsin oder Keratin zurückzuführen.

Die MALDI-TOF-Analysen wurden von der AG Dencher, TU Darmstadt durchgeführt.

Tabelle 14: Erhaltene Fragmente bei den MALDI-TOF-Analysen.

Die Analysen Nr.1 bis 7 wurden von der Firma ESPLORA, Darmstadt, die Analysen Nr. 8 und 9 von der AG Dencher, TU Darmstadt durchgeführt.

Nr.	Fragmente									
1	1051,5924 2102,0009	1197,6431 2116,1145	1288,6457 2720,2459	1396,7776 2748,2557	1405,7475	1457,7882	1466,7336	1851,8885	1905,0868	
2	1023,5497 1632,9336 2748,2382	1222,6188 1779,7898	1288,6611 2115,0997	1420,7539 2356,9826	1460,7335 2417,1707	1492,7360 2456,2686	1590,8787 2461,2016	1599,8420 2513,2745	1601,8595 2720,2679	
3	817,2857 2348,2040	1002,6085 2569,3257	1051,6931 2720,2637	1722,9328 2721,2822	1959,0478 2748,3778	2017,0480	2115,1444	2303,0622	2335,0115	
4	1163,5710 1811,9169	1396,8110 1842,9407	1405,7841 1843,9590	1440,8395 1853,9406	1457,7982 1870,9776	1462,7020 1905,0730	1496,8078 2116,1090	1702,8958 2707,1934	1779,9323 2720,2476	
5	769,4849 1638,8457	817,2802 1793,9025	1033,4997 1833,8424	1180,5352 2018,0474	1276,7359 2052,1227	1457,7878 2399,0456	1488,7629 2748,3394	1503,7884	1549,8292	
6	818,2840 1874,9532	1023,6498 2467,2571	1025,6466 2618,2424	1051,6922 2720,2499	1372,8025 2749,2730	1503,8405	1585,9165	1599,9197	1755,9489	
7	2618,2717	2707,2462	2720,1908	2748,2596						
8	741,2723 850,5376 1152,6864 1326,7399 1552,7457 1779,7630	769,2924 861,2830 1165,7448 1335,8087 1576,0694 1784,7509	773,4405 863,2661 1178,5941 1384,7008 1577,8462 1791,7862	782,4825 868,5370 1236,6574 1400,7121 1635,7590 2024,1272	786,3183 882,5686 1254,6763 1412,7102 1675,8377 2398,9973	828,4875 905,4777 1262,7165 1428,6707 1677,9299 2706,0457	838,5130 912,4208 1279,7333 1448,8294 1714,8427	848,2639 996,6142 1288,6613 1475,7922 1753,8471	1051,7278 1302,6798 1511,8699 1758,9872	
9	527,3093 868,5457 1024,6240 1240,7310 2225,1530	540,2872 870,5396 1051,7040 1240,9900 2299,2040	567,3468 899,5462 1070,6540 1268,7510 2680,1890	572,3223 912,5289 1151,7190 1391,7300 3279,6320	585,3599 913,5634 1165,6770 1410,8260 3293,5690	588,3161 927,5627 1212,7160 1492,7390 3294,5580	640,4365 929,5273 1224,7390 1940,9590 3341,5430	743,4626 968,5806 1226,7230 1962,9480 3353,6830	856,5244 996,6074 1238,7260 2208,1450 4947,5550	

Das Protein sollte daraufhin N-terminal sequenziert¹ werden. Dabei gab es jedoch kein Ergebnis. Es wurde vermutet, dass aufgrund einer N-terminalen Blockierung ein Edmann-Abbau nicht möglich ist.

Da N-terminale Blockierungen bei Entfaltungen in Puffern mit 8 M Harnstoff und pH-Werten größer 8,0 häufig künstlich in das Protein eingefügt werden (Lottspeich und Zorbas, 1998), wurde versucht durch Senkung des pH-Wertes von pH 8,5 auf pH 6,0 bei der Inkubation des Schwefels einer möglichen künstlichen Blockierung zu vermeiden. Bei einer Entfaltung bei pH 6,0 konnte jedoch kein Protein isoliert werden (Abb.50).

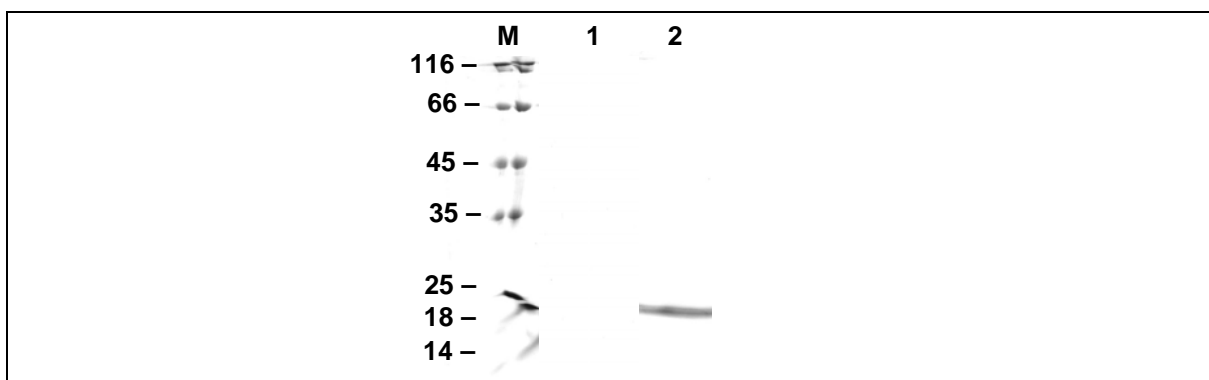


Abbildung 50: PA-Gele mit aufgetragenen Proben filtrierter Überstände nach Inkubation des Schwefelsedimentes mit harnstoffhaltigen Puffern verschiedener pH-Werte.

M = Massenstandard #SM0431 in kDa; 1 = Inkubation bei pH 6,0; 2 = Inkubation bei pH 8,5.

Wegen der N-terminalen Blockierung konnte der Edmann-Abbau nicht mit einer über SDS-PAGE isolierten und ausgeschnittenen Protein-Bande durchgeführt werden. So wurde versucht, die Sequenzierung direkt mit dem Schwefelsediment (aerobe Kultivierung mit S°

¹ durchgeführt vom Biochemischen Institut der Uni Gießen, AG Linder

ohne Behandlung des Schwefels mit harnstoffhaltigem Puffer durchzuführen². Die Sequenzierung ergab folgende Mischsequenz:

$$\left(\begin{smallmatrix} S \\ A \end{smallmatrix}\right)_E E \left(\begin{smallmatrix} G \\ I \\ L \end{smallmatrix}\right)_V V I \left(\begin{smallmatrix} S \\ Y \end{smallmatrix}\right) X \left(\begin{smallmatrix} A \\ Y \end{smallmatrix}\right) X \left(\begin{smallmatrix} V \\ T \end{smallmatrix}\right) I \left(\begin{smallmatrix} F \\ Y \end{smallmatrix}\right) P \left(\begin{smallmatrix} A \\ G \end{smallmatrix}\right) X \left(\begin{smallmatrix} T \\ E \\ P \end{smallmatrix}\right)_L L \left(\begin{smallmatrix} ? \\ ? \end{smallmatrix}\right) Y \left(\begin{smallmatrix} G \\ Y \end{smallmatrix}\right)$$

(wobei bspw. $\left(\begin{smallmatrix} S \\ A \end{smallmatrix}\right) = S$ oder A). Der Sequenzvergleich mit der internen Datenbank von *Acidianus ambivalens* (Conrad, 2003) ergab eine sinnvolle Übereinstimmung mit einem DNA-Abschnitt, genannt contig275 (Abb.51A). Der contig 275 enthält die Gensequenz für ein hypothetisches Protein. Die ansequenzierte Region beginnt mit einem Serin. Bis zum ersten Stopcodon im contig ist das daraus resultierende Protein 310 Aminosäuren lang, was einer Masse von 34,1 kDa entspricht (Abb.51B). Der theoretische pI des Proteins liegt bei 6,04 (Prot-Param). Das Protein besitzt zu 23,55% hydrophobe Aminosäuren. Negativ geladene Aminosäurereste sind zu 3,87%, positiv geladene Reste zu 3,22% im Protein

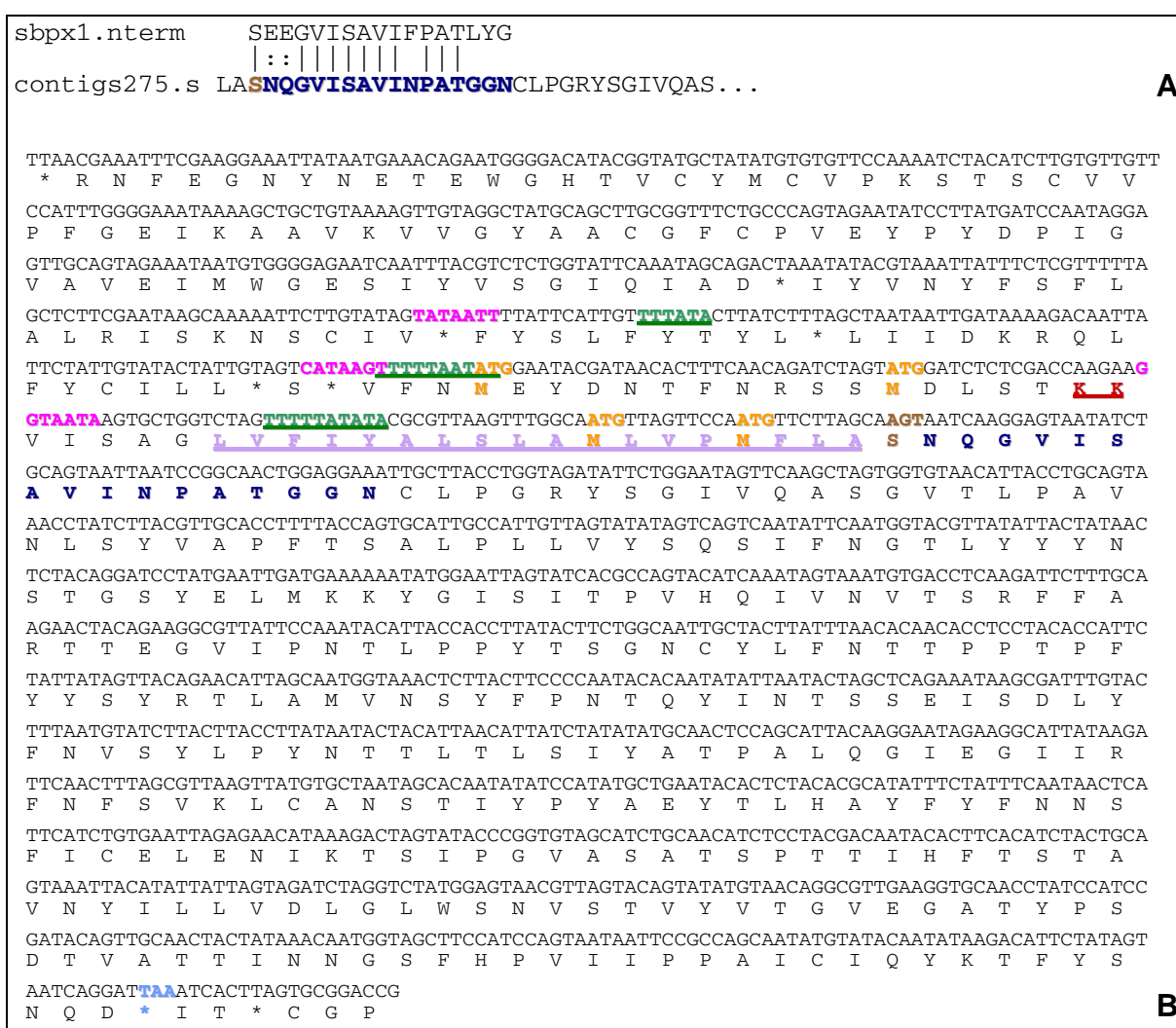


Abbildung 51: Nukleotidsequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des contig 275. A. Vergleich der erhaltenen Sequenz mit contig 275; B. Sequenz des contig 275.

Blau = ansequenzierte Region, **braun** = durch Sequenzierung bestimmter Startpunkt des Proteins; **orange** = vor der ansequenzierten Region liegende Methionine, **grün** = TATA-Box-Motiv, **rot** = Signalsequenz für möglichen Leader, **hellblau** = erstes Stop-Codon im Leseraster, **lila** = hydrophobe Aminosäurekette, **rosa** = mögliches BR-Element.

² durchgeführt vom Max-Planck-Institut Martinsried, AG Lottspeich

vorhanden (Prot-Param). Die vorherrschende Aminosäure im SBP ist Threonin gefolgt von Serin (Tab.15).

Vor dem experimentell bestimmten Proteinstart befinden sich vier Methionine im Abstand von 4, 8, 30 und 41 Aminosäuren vor dem ansequenzierten Proteinstart (Abb.51B). Vor den ersten drei Methioninen liegt jeweils ein TATA-Box-Motiv (Abb.51B). Hinter dem zweiten Methionin liegt weiterhin ein Sequenzmotiv für eine Signalsequenz mit zwei Lysinen und einem darauf folgenden hydrophoben Aminosäureteil, was für das zweite Methionin als Startpunkt einer Signalsequenz sprechen würde. Beim vierten Methionin liegt kein TATA-Box-Motiv davor, so dass es als Start ausgeschlossen wurde. Im Folgenden wird das reife Protein ohne Signalsequenz als SBP, die Protein-vorstufen mit möglicher *leader*-Sequenz als PLL (ausgehend vom ersten Methionin), PLM (ausgehend vom zweiten Methionin) und PLK (ausgehend vom dritten Methionin) bezeichnet. Ein Vergleich der PLM- mit der SBP-Aminosäuresequenz zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tab.15).

Tabelle 15: Aminosäurezusammensetzung des SBP mit (PLM) und ohne Signalsequenz.

Aminosäuren	SBP		PLM	
	Menge	Anzahl in %	Menge	Anzahl in %
Alanin	19	6,129	23	6,765
Arginin	5	1,613	5	1,471
Asparagin	25	8,065	25	7,353
Aspartat	4	1,290	5	1,471
Cystein	5	1,613	5	1,471
Glutamin	8	2,581	8	2,353
Glutamat	8	2,581	8	2,353
Glycin	18	5,806	19	5,588
Histidin	4	1,290	4	1,176
Isoleucin	25	8,065	27	7,941
Leucin	23	7,419	29	8,529
Lysin	5	1,613	7	2,059
Methionin	2	0,645	5	1,471
Phenylalanin	16	5,161	18	5,294
Prolin	22	7,097	23	6,765
Serin	32	10,323	35	10,294
Threonin	36	11,613	37	10,882
Tryptophan	1	0,323	1	0,294
Tyrosin	29	9,355	30	8,824
Valin	23	7,419	26	7,647
saure (D + E)	12	3,871	13	3,824
basische (H + K + R)	14	4,516	16	4,706
hydrophile (D + E + H + K + R)	26	8,387	29	8,529
hydrophobe (I + L + M + V)	73	23,548	87	25,588
neutrale (G + N + P + Q + S + T + Y)	170	43,277	177	52,059
aromatische (F + W + Y)	43	14,839	49	14,412

Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit dem Programm Psi-Pred ergab im Bereich der PLM Signalsequenz eine lange α -Helix-Struktur und kein β -Faltblatt (Abb.52). Bei der PLL-Signalsequenz liegt vor der α -Helix noch eine coil-Struktur. Im SBP wurden 8 α -Helices, 21 β -Faltblatt-Strukturen sowie 25 coil-Strukturen vorhergesagt.

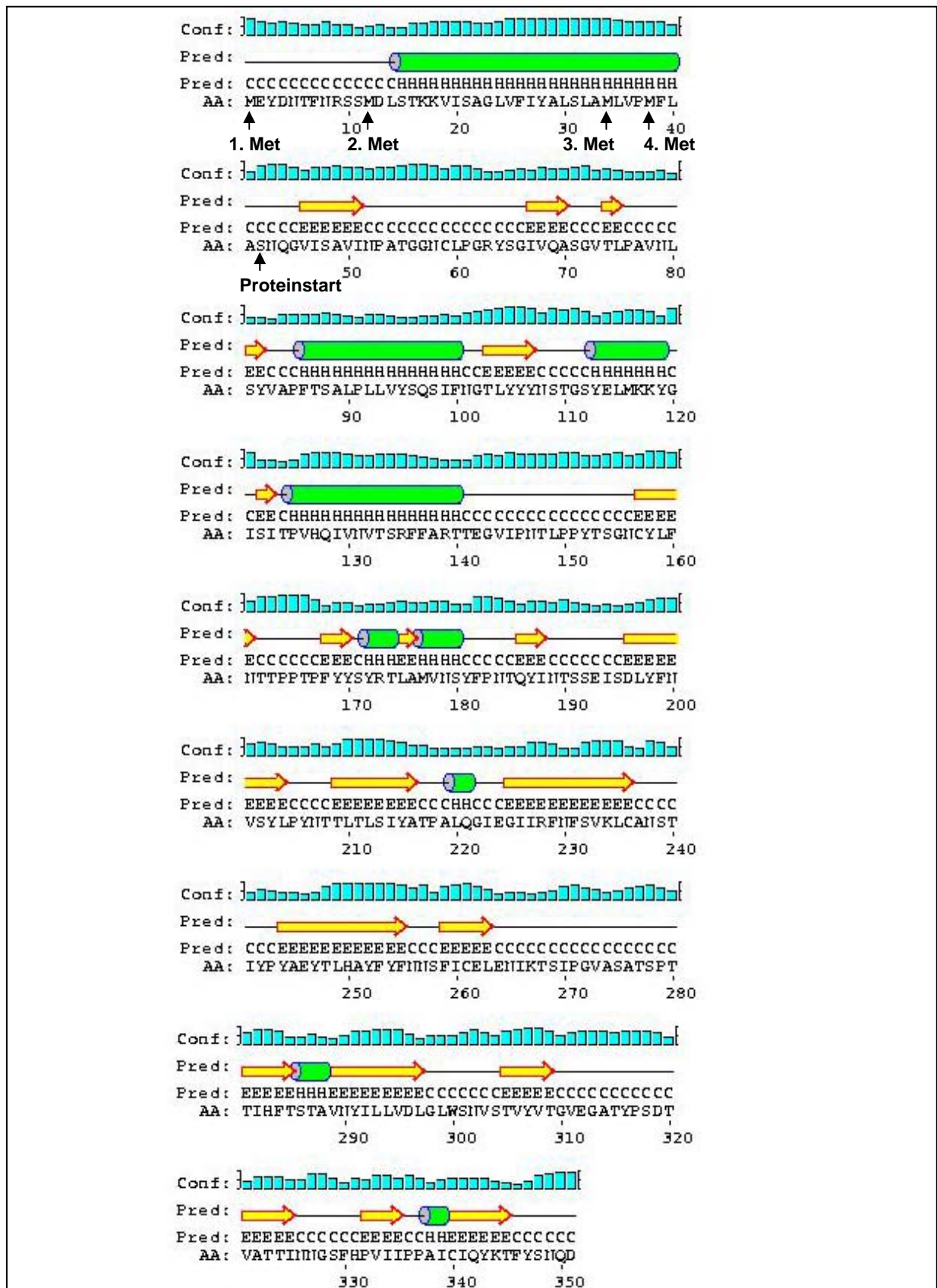






Abbildung 52: Vorhersage der Faltung des SBP ausgehend vom ersten Methionin (PLL) im contig mit dem Programm Psi-Pred.

 = α -Helix,  = β -Faltblatt, c_{conf} :  = Signifikanz der Vorhersage,  = coil-Struktur, AA = Zielsequenz, Pred = vorhergesagte Sekundärstruktur, wobei (H = α -Helix, E = β -Faltblatt, C = coil) .

Die SBP-Signalsequenz ausgehend vom zweiten Methionin (PLM) wurde mit den Signalsequenzen von *Sulfolobus solfataricus* (SSO) verglichen (siehe VIII.5; Albers & Driessen, 2002). Dabei zeigte sich, dass eine signifikante Ähnlichkeit der Sequenz weder zwischen den SSO-Sequenzen untereinander noch mit der PLM-Sequenz festgestellt werden konnte (siehe VIII.5). Signalpeptide unterteilt man in vier Signalpeptidklassen (siehe Abb.77; Albers & Driessen, 2002). In der PLM-Signalsequenz war eine H-Domäne mit 17 hydrophoben Aminosäuren zu sehen (Abb.53). Die Strukturvorhersage mit Psi-Pred ergab dort einen α -helicalen Bereich. Vor diesem hydrophoben Bereich liegt das Sequenzmotiv mit den zwei positiv geladenen Lysinen. Bei diesem Bereich könnte es sich um die N-Domäne handeln. Der hydrophobe Aminosäurebereich erstreckt sich bis zum Proteinstart. Da sich jedoch der α -helicale Bereich nur bis zur vorletzten Aminosäure erstreckt, könnte es sich bei dem Alanin, welches genau vor dem durch Sequenzierung bestimmten Proteinstart liegt, um die C-Domäne handeln. Der Vergleich des PLM mit den vier Signalpeptidklassen zeigte somit, dass es sich bei der PLM-Signalsequenz um ein sekretorisches Signalpeptid handeln könnte.

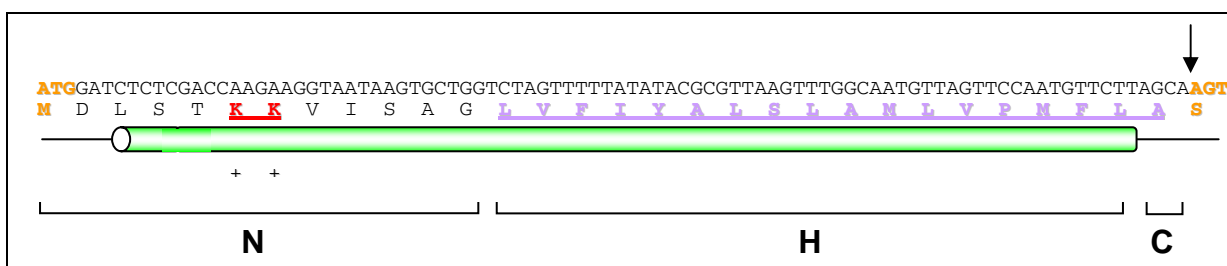


Abbildung 53: Analyse der PLM-Signalsequenz.

Die gezeigten Domänen (N, H und C) basieren auf Vermutungen aufgrund der vorhandenen Aminosäuresequenz. Die gezeigten Strukturvorhersagen (● = α -Helix und — = coil-Struktur) sind mit dem Programm Psi-Pred berechnet worden. Rot = Sequenzmotiv, orange = Start des *leaders* (PLM) bzw. des Proteins (S), lila = hydrophober Aminosäurebereich, Pfeil = mögliche Erkennungsstelle für die Signalpeptidase.

Die Suche in der Nukleotidsequenz des contigs nach einem BR-Element (*transcription factor B recognition element*) zeigte jeweils ein mögliches BRE kurz vor den TATA-Box für PLL, PLM und PLK. Die gefundenen Sequenzen wichen leicht von der Consensus-Sequenz ab. Da jedoch die BRE-Sequenz nicht sehr konserviert ist, könnte es sich trotzdem um ein BR-Element handeln.

Ein Berechnung der Aminosäuresequenz ausgehend vom ersten Methionin (PLL) mit dem Programm InterProScan (EMBL-EBI) berechnete den Proteinstart des SBP genau auf das durch Sequenzierung bestimmte Serin. Die Formel vom SBP aufgrund der atomaren Zusammensetzung lautet $C_{1567}H_{2348}N_{372}O_{465}S_7$. Die Halbwertszeit des Proteins beträgt >20 h in Hefe sowie > 10 h in *E. coli* und das Protein wurde als stabil klassifiziert (Prot-Param). Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten mit dem Programm Prot-Param ergab bei 280 nm einen Extinktionskoeffizienten von $43050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.4 Sequenzvergleich des SBP

Ein Vergleich der SBP-Sequenz mit der offiziellen Datenbank über die Programme GCG-Peptide-Sort (Accelrys) und Blast (Expasy) brachte keine Übereinstimmung (siehe VIII.4).

Die Sequenz des SBP wurde hypothetisch mit Trypsin verdaut (Expasy – Peptide Mass; Wilkins et al., 1997; Gasteiger et al., 2005). Mit dem hypothetischen Verdau des SBP (Tab.16) sollten die erhaltenen Fragmente der MALDI-TOF-Analysen (Tab.14) verglichen werden (Abb.54).

Tabelle 16: Fragmente des hypothetischen Trypsinverdau von SBP.

Nr.	Fragmente									
10	540,2929 3954,8393 7964,0240 12709,3320	741,3930 4396,1059 8051,1353 12842,2967	874,3577 4677,2145 8092,1190	1884,0337 5857,9601 8906,4752	2012,1287 5986,0550 10036,9172	2125,0818 6181,1042 10558,1922	2405,3088 6261,1218 10759,2924	2533,4037 6903,4793 10839,3008	3874,8309 7851,0709 11986,9568	

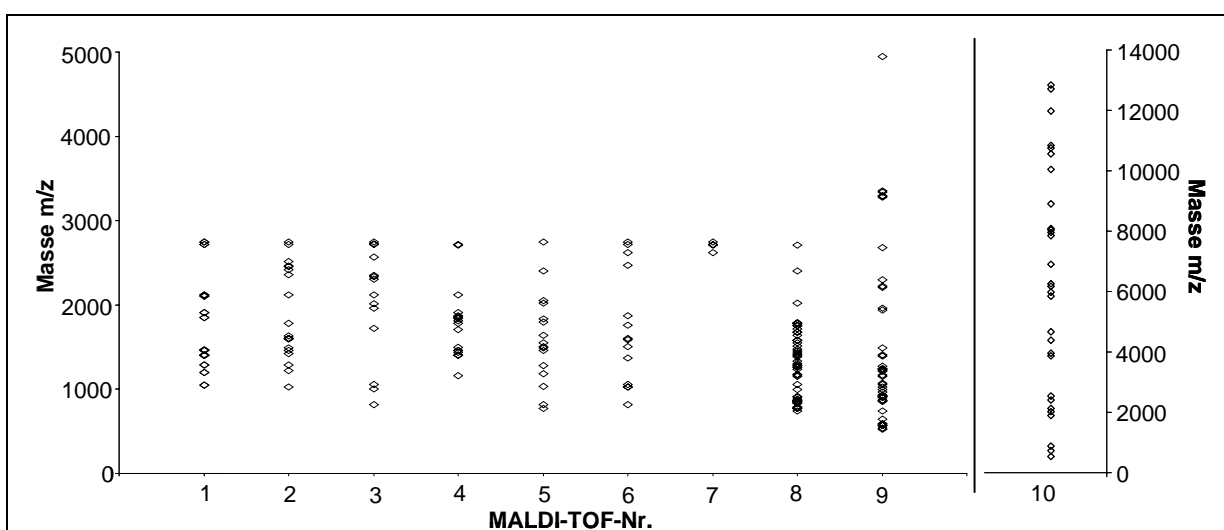


Abbildung 54: Vergleich der Fragmente der MALDI-TOF-Analysen 1-9 und des hypothetischen Trypsinverdau von SBP (10).

Der Vergleich der Fragmente mit Peptide Mass brachte keine Übereinstimmung. Die Suche der durch MALDI-TOF erhaltenen Fragmente in der SBP-Sequenz mit Find-Pept (Expasy; Gattiker et al., 2002; Gasteiger et al., 2005) zeigte, dass fast alle durch MALDI-TOF erhaltenen Fragmente nicht bei hypothetischen Trypsinverdau im SBP vorhanden waren. Auf die durch MALDI-TOF bestimmten Fragmentlängen kam man im SBP nur, wenn man das Protein unspezifisch verdaute (siehe VIII.2). Beim Trypsin- und Bromcyanverdau des SBP zeigte sich, dass es unspezifisch gespalten wurde und viele kleine Fragmente entstanden, die durch SDS-PAGE nicht mehr detektiert werden konnten (eigene Beobachtungen und Mentele [AG Lottspeich], persönliche Mitteilung).

2.2.5 Glykosylierung

Auffallend war die Größenspanne des Schwefel-Binde-Proteins, welches bei der SDS-PAGE eine Masse zwischen 14 und 45 kDa aufwies (Abb.55A). Ein Größenunterschied eines Proteins ist häufig auf eine Glykosylierung zurückzuführen, die häufig bei extrazellulären Proteinen auftritt. Zur Überprüfung ob SBP glykosyliert ist, wurde eine Alcian-Blau-Färbung durchgeführt (Abb.55B), die Gegenfärbung erfolgte mit Coomassie (Abb. 55C).

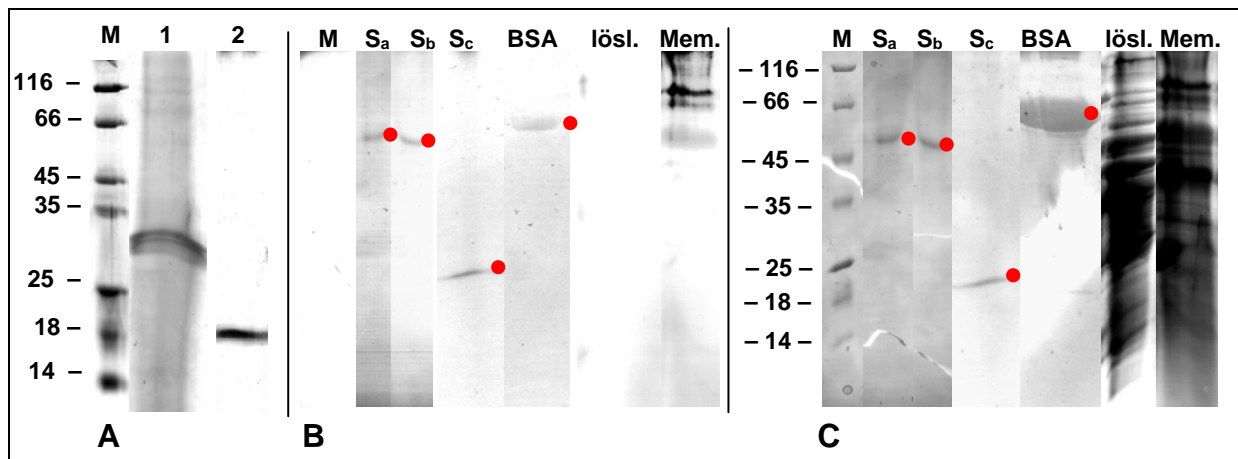


Abbildung 55: SDS-PA-Gele zum Nachweis der Glykosylierung des SBP.

A = Nachweis der unterschiedlichen Masse des SBP (Coomassie gefärbt); B = Alcian Blau gefärbt; C = Coomassie gefärbt. Die Punkte geben die Lage der jeweiligen Proteine an.

M = Massenstandard #SM0431 in kDa, 1 = SBP auf Gel 1, 2 = SBP auf Gel 2, S_a = Schwefel-Binde-Protein mit DOC isoliert, S_b = Schwefel-Binde-Protein mit Triton isoliert, S_c = Schwefel-Binde-Protein mit Harnstoff isoliert, BSA = Rinderserumalbumin, lösl. = cytoplasmatische Proteinfraction von *Ac. amb.*, Mem. = Membransolubilisat von *Ac. amb.*

Mit der Alcian-Blau-Färbung werden spezifisch Zucker im Protein angefärbt (Wardi & Michos, 1972), wobei allerdings nicht bekannt ist, ob die Färbung umso intensiver ist, je mehr Zucker ein Protein enthält. Unglykosylierte Proteine sind ungefärbt.

Auf dem Alcian-Blau gefärbten Gel war eine Bande bei der glykosylierten Positivkontrolle BSA zu erkennen (Abb.55B). Als Negativkontrolle diente der unglykosylierte Marker, bei dem wie erwartet keine Banden zu sehen waren. Ebenso waren in der löslichen Proteinfraction von *Acidianus* keine Banden erkennbar. In der Membranfraction waren bei einer Masse von 66 kDa bis über 116 kDa glykosylierte Proteine zu erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um S-Layer, da die Zellwand von *Acidianus* aus S-Layer besteht, welche so gut wie immer glykosyliert sind (Moens *et al.*, 1997; Rehm, 2002c). Auch beim SBP war eindeutig eine gefärbte Bande bei der Alcian-Blau-Färbung zu erkennen.

Bei der Gegenfärbung des Gels mit Coomassie war beim BSA ebenso wie beim Membransolubilisat von *Acidianus* eine Zunahme der Färbeintensität im Gegensatz zur Alcian-Blau-Färbung zu sehen (Abb.55C). Diese Zunahme der Färbeintensität war beim

SBP hingegen nicht zu erkennen. Dort war die Färbung mit Alcian-Blau genauso stark, wie die mit Coomassie.

Zucker können an ein Protein O- oder N-glykosidisch gebunden sein. Die Consensus-Sequenz für eine N-Glykosylierung von Protein lautet NXS/T (Konrad *et al.*, 2002, Lottspeich & Zorbas, 1998; Rehm, 2002c; Wacker *et al.*, 2002).

Die Suche nach beiden möglichen Consensus-Sequenzen in der Sequenz des SBP brachte 13 mögliche Stellen zutage, wobei nach Glyko-Mod eine Stelle errechnet wurde, an der die Bindung eines N-glykosidisch gebundenen Zuckers wahrscheinlich ist (siehe VIII.3).

O-glykosidisch gebundene Zucker binden an Serin oder Threonin, besitzen aber keine spezifische Consensus-Sequenz (Rehm, 2002). Die Sequenz des SBP enthält 68 mögliche Stellen für eine O-Glykosylierung, wobei in zwei Regionen die Bindung von O-glykosidisch gebundenen Zuckern nach Berechnung mit dem Programm Glyko-Mod wahrscheinlich ist (siehe VIII.3).

2.2.6 Deglykosylierung

Um festzustellen, welche Art der Bindungen bei der Glykosylierung des SBP vorliegen, wurde versucht, enzymatisch das Protein zu deglykosylieren. Dazu wurden die drei Enzyme PNGaseF, O-Glycosidase und Neuraminidase verwendet. Während PNGaseF N-glykosidisch und O-Glycosidase O-glykosidisch-gebundene Zucker abspaltet, hydrolysiert die Neuraminidase die Glykolipide. Befinden sich im Protein N- und O-verknüpfte Kohlenhydrat-Ketten kann durch Inkubation des Proteins mit N-Glycosidase F, O-Glycosidase und Neuraminidase eine vollständig Deglykosylierung erreicht werden.

SBP wurde, mit allen Permutationen der drei Enzymen, deglykosyliert. Die Abspaltung der Zucker sollte einerseits einen Massenverlust des Proteins zur Folge haben, der über SDS-

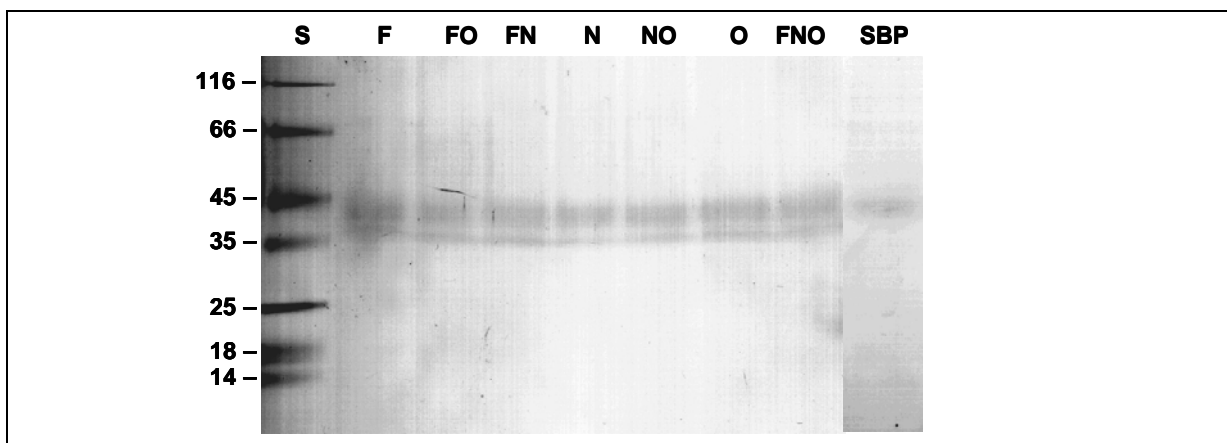


Abbildung 56: SDS-PA-Gel der Deglykosylierung Coomassie gefärbt.

S = Massenstandard #SM0431, in kDa, F = Deglykosylierung von SBP mit PNGaseF, O = Deglykosylierung von SBP mit O-Glycosidase, N = Deglykosylierung von SBP mit Neuraminidase.

PAGE sichtbar wäre (Lottspeich & Zorbas, 1998), des Weiteren sollte bei teilweiser Deglykosylierung die Färbeintensität der Alcian-Blau-Färbung abnehmen, bzw. bei vollständiger Deglykosylierung sich das Protein überhaupt nicht mehr mit Alcian-Blau anfärben lassen.

Neben dem deglykosyliertem SBP wurden der unglykosylierte Massenstandard, das glykosylierte BSA sowie das original SBP auf das Gel aufgetragen (Abb.56). Bei dem Alcian Blau gefärbten Gel sah man keine Veränderung der Färbeintensität (nicht gezeigt). Allerdings waren bei allen Deglykosylierungen eine Doppelbande erkennbar, die nicht im nicht deglykosylierten SBP vorkam (Abb.56).

2.2.7 Eisen und Färbung

Bei allen Proteinlösungen, welche aus dem Schwefelsediment isoliert wurden, war eine starke bräunliche Färbung zu erkennen, welche bei proteinfreien Lösungen (Behandlung des Schwefels mit harnstoffhaltigem Puffer ohne vorherige Inkubation oder nach anaerober Kultivierung) nicht vorhanden waren (Abb.45). Aufgrund dieser Färbung waren Proteingehaltsbestimmungen und UV/Vis-Spektren ungenau und nicht zu werten. Die bräunliche Färbung war auch auf ungefärbten Gelen zu sehen (Abb. 57). Die schwarze Färbung ließ sich nicht durch Zentrifugation sedimentieren, wohl aber durch TCA, so dass zwischen der Färbung und dem Protein ein Zusammenhang, bzw. eine Bindung bestehen könnte.

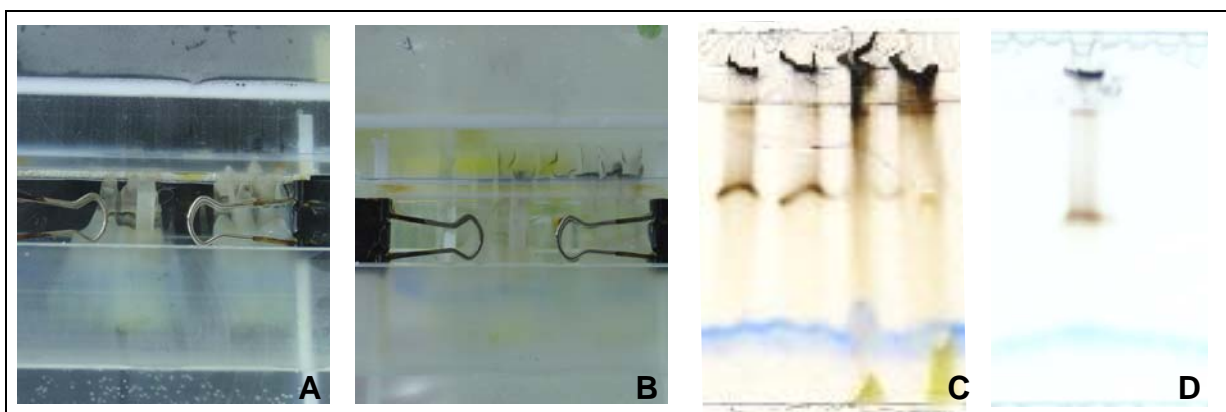


Abbildung 57: Fotos eines PA-Gels beim Lauf (A & B) und ungefärbter PA-Gele (C & D).

Die Vermutung, dass es sich bei der Färbung um Eisen handelt, wurde durch Eisen- und Sulfid-Gehaltsbestimmungen überprüft (Abb.58). Eine Berechnung der Werte in nmol Eisen (bzw. Sulfid) / μg Protein war nicht möglich, da aufgrund der extremen Färbung keine

Proteingehaltsbestimmungen möglich war. Die Angaben erfolgten deshalb in nmol Eisen (bzw. Sulfid) / μl Lösung.

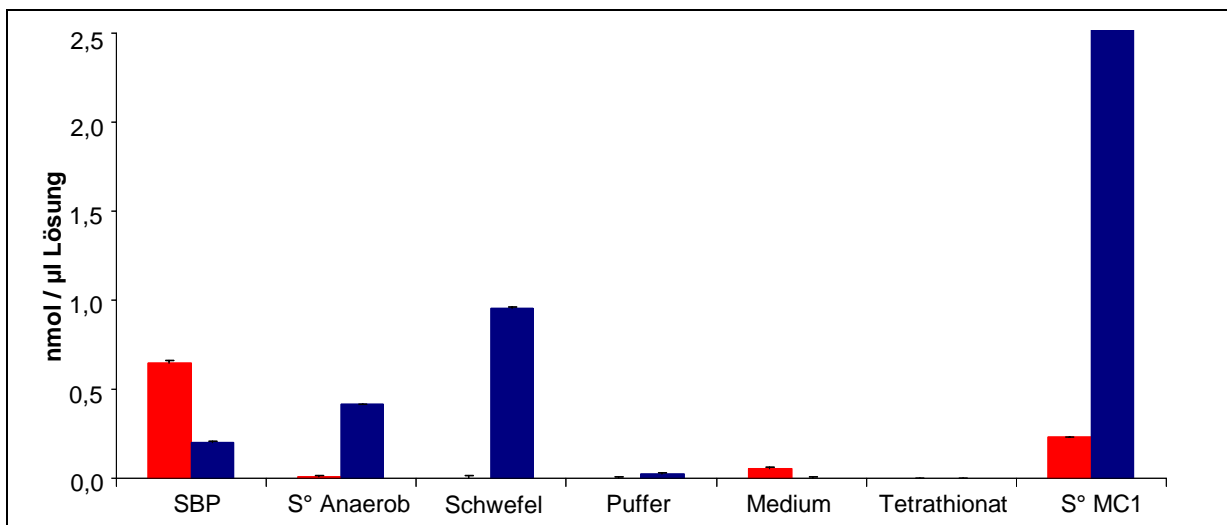


Abbildung 58: Eisen- und Sulfid-Gehaltsbestimmungen.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der einzelnen Fraktionen, die Standardabweichungen sind zwischen der ersten und der zweiten Messung berechnet worden. Eine Berechnung der Standardabweichungen in Bezug auf die Mittelwerte, ist aufgrund der unterschiedlichen Proteingehalte nicht möglich.

SBP = Überstand des Schwefels nach aeroben Wachstum mit Schwefel, enthält das SBP, S° Anaerob = Überstand des Schwefels nach anaeroben Wachstum mit Schwefel, Schwefel = Überstand des Schwefels ohne Inkubation, Medium = *Acidianus*-Medium ohne verwertbare Schwefelverbindungen, Tetrathionat = Überstand des Schwefels nach aeroben Wachstum mit Tetrathionat, S° MC1 = Überstand des Schwefels nach Wachstum von *Sulfurisphaera* MC1.

In der SBP-Lösung war im Vergleich zu allen andern gemessenen Lösungen bis zu 72-mal mehr Eisen vorhanden. Im Medium wurde ein leicht erhöhter Eisengehalt gemessen, der auf das im *Acidianus*-Medium enthaltene Eisensulfat zurückzuführen ist (siehe Tab.11). Im Puffer war, wie erwartet kein Eisen detektierbar. Die gemessenen Eisenwerte scheinen also proteinabhängig zu sein.

```

SNQGVISAVINPATGGNCLPGRYSGIVQASGVTLPVAVNLSYVAPFTSALPPLLVSQ
SIFNGTLYYYNSTGSYELMKKYGISITPVHQIVNVTSRFFARTTEGVIPTNLPPT
SGNCYLFNTTPTTPTFYYSYRTLAMVNSYFPNTQYINTSSEISDLVFNVSYLPYNTT
LTLISIYATPALQGIEGIIRFNFVSKLCANSTIYPYAEYTLHAYFYFNNSFICELEN
IKTSIPGVASATSPTTIHFTSTAVNYILLVDLGLWSNVSTVYVVNYILLVDLGLWS
NVSTVYVTGVEGATYPSDTVATTINNGSFHPVVIIPPAICIQYKTFYSNQD*

```

Abbildung 59: Abgeleitete Aminosäuresequenz des SBP.

Rot = Cystein; blau = Histidin; grün = Asparagin; gelb = Prolin.

Die Konzentration an Sulfid war hingegen bei der MC1-Lösung am höchsten. Die SBP-Lösung enthielt 2,1-mal weniger Sulfid als zum Überstand nach anaerober Kultivierung mit Schwefel. Im Puffer wurden geringfügige Sulfidwerte gemessen, die 7,9-mal niedriger lagen, als die der SBP-Lösung. In der TT-Lösung war kein Sulfid nachweisbar. Der Eisen- zu Sulfidgehalt lag in der SBP-Lösung bei 3,3. Eine Consensus-Sequenz (CxxCxxCxxxCP; statt c alternativ N oder H) war in der Aminosäuresequenz des SBP nicht zu detektieren (Abb.59).

2.2.8 Fällung des SBP

Durch die Assoziation der schwarzen Färbung mit dem Protein (Abb.45) konnte der Erfolg einer Proteinfällung auch quantitativ beobachtet werden (Abb.60).

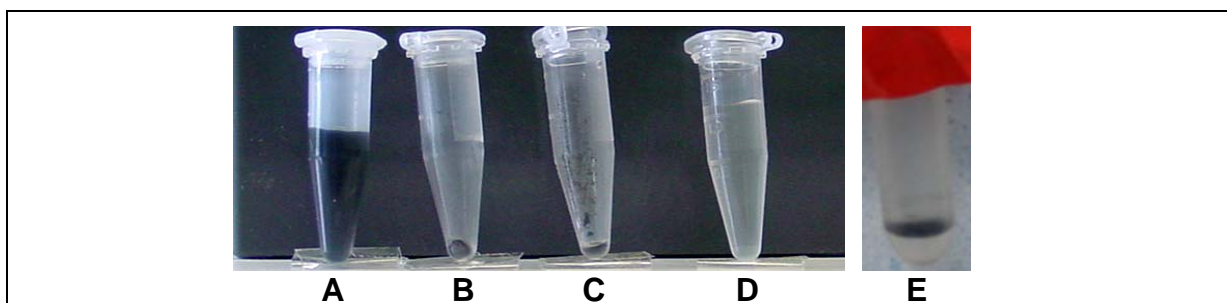


Abbildung 60: Foto von Proben in verschiedenen Stadien einer Fällung.

A = vor der TCA-Fällung, B = nach Zugabe von TCA, C = Sediment nach der TCA-Fällung, D = Überstand nach der TCA-Fällung, E = Chloroform-Methanol-Fällung.

Bei der Eisen-Gehaltsbestimmung (siehe 2.2.7) fiel auf, dass bei Zugabe von HCl, das Protein (samt Färbung) ebenfalls ausfiel. Bei Tests verschiedener Proteinfällungen (Chloroform-Methanol, TCA, HCl, Ethanol und Aceton) erwies sich die Chloroform-Methanol-Fällung hierbei als sicherste Fällmethode (Abb.61A). Das Protein war in der Interphase aufgrund seiner schwarzen Färbung recht gut zu erkennen (Abb.61E).

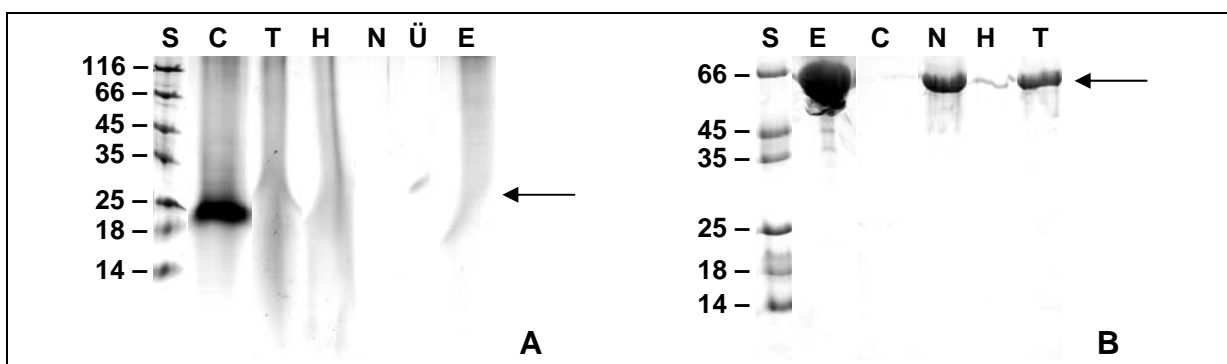


Abbildung 61: PA-Gele zur Überprüfung verschiedener Proteinfällungen.

A = Fällung des SBP, B = Fällung von BSA. S = Massenstandard #SM0431 in kDa, C = Chloroform-Methanol-Fällung, T = TCA-Fällung, H = HCl-Fällung, N = Aceton-Fällung, Ü = Überstand der Aceton-Fällung, E = Ethanol-Fällung.

Um die Protokolle der Fällungen zu überprüfen, wurde BSA als Positivkontrolle verwendet (Abb.61B). Hierbei zeigte sich, dass bei BSA die Fällungen mit Ethanol, Aceton und TCA möglich waren. Eine Proteinisolierung mittels Chloroform-Methanol- oder HCl-Fällung brachte hingegen kein Ergebnis.

Das SBP ließ sich weder mit Ethanol, noch mit Aceton fällen. Die Kontrolle des Überstandes bei der Aceton-Fällung zeigte, dass das Protein hierbei in Lösung gegangen war, wie dies nur bei hydrophoben Proteinen der Fall ist (Abb.61A).

2.3 Isolierung von S-Layern

Es wurde versucht aus *Acidianus*-Zellen, die aerob mit Schwefel, aerob mit Tetrathionat, aerob mit Schwefel und Tetrathionat und anaerob mit Schwefel gewachsen waren, S-Layer

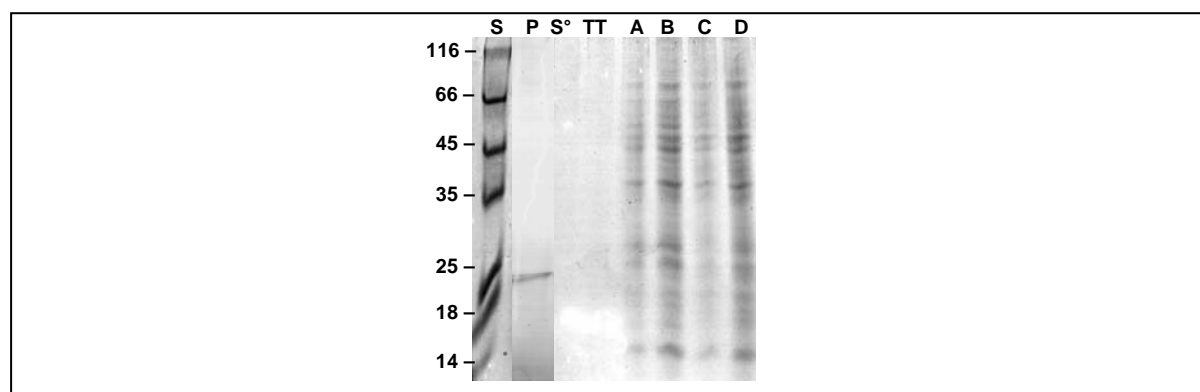


Abbildung 62: PA-Gel der S-Layer-Isolierung.

S = Massenstandard #SM0431, in kDa; P = Schwefel-Binde-Protein; S° = S-Layer-Isolierung aus dem Schwefelsediment nach aeroben Wachstum der Kulturen mit Schwefel; TT = S-Layer-Isolierung aus dem Schwefelsediment nach Wachstum der Kulturen mit Tetrathionat; A = S-Layer-Isolierung aus Zellen nach aerobem Wachstum mit Schwefel; B = S-Layer-Isolierung aus Zellen nach anaerobem Wachstum mit Schwefel; C = S-Layer-Isolierung aus Zellen nach aerobem Wachstum mit Tetrathionat; D = S-Layer-Isolierung aus Zellen nach aerobem Wachstum mit Schwefel und Tetrathionat.

zu isolieren. Auf der SDS-PA-Gel waren bei den aufgetragenen Proben der Isolierung von S-Layer-Proteinen aus *Acidianus* mehrere Banden nach Färbung des Gels mit Coomassie sichtbar, unabhängig von den Wachstumsbedingungen der Kultur (Abb.62, Taschen A – D). Der Versuch einer Isolierung von S-Layern aus dem Schwefelsediment nach aeroben Wachstum der Kultur mit Tetrathionat zeigte hingegen keine Proteinbanden auf dem PA-Gel (Abb.62, Tasche TT). Auch die Isolierung von S-Layern aus dem Schwefelsediment nach aeroben Wachstum der Kultur mit Schwefel zeigte keine Proteine (Abb.62, Tasche S°). Eine Behandlung des Schwefelsedimentes mit harnstoffhaltigem Puffer zeigte, dass im Schwefelsediment jedoch das Schwefel-Binde-Protein enthalten war (Abb.62, Tasche P). Somit handelt es sich beim SBP nicht um einen S-Layer.

3 *sbp*-Überexpression in *E. coli*

3.1 Klonierung

Für die Herstellung der Konstrukte wurden die entsprechenden Leserahmen der *sbp*-DNA ohne Signalsequenz (*pol*) sowie der *sbp*-DNA mit möglicher Signalsequenz (*pll*, *plm*, *plk*) mittels PCR aus der genomischen DNA von *Acidianus ambivalens* amplifiziert und in die Expressionsvektoren pTYB4, pET28c, pMAL-c2X und pMAL-p2X inseriert (siehe Tab.17 & III.4.3). Bei der Sequenzierung lagen alle untersuchten Inserts *in frame* und in der richtigen Orientierung im Vektor vor.

Für die Transformation von pET28c- und pTYB4-Konstrukten wurden BL21-Zellen, für pMAL-c2X- und pMAL-p2x-Konstrukte TB1-Zellen verwendet. Zusätzlich wurde die Zellen mit dem Hilfsplasmid CodonPlus transformiert (siehe auch III.4).

Tabelle 17: Übersicht über die hergestellten und verwendeten Konstrukte.

Konstruktnamen	tL	tM	tK	eO	pL	pM	pK	pO	cL	cM	cK	cO
Insert	<i>pll</i>	<i>plm</i>	<i>plk</i>	<i>pol</i>	<i>pll</i>	<i>plm</i>	<i>plk</i>	<i>pol</i>	<i>pll</i>	<i>plm</i>	<i>plk</i>	<i>pol</i>
Vektor	pTYB4			pET28c	pMAL-p2X				pMAL-c2X			
Zellen	BL21				TB1							
Hilfsplasmid	CodonPlus (CP)											

3.2 Expression

3.2.1 Expression von pTYB4-SBP in BL21-Zellen

Der pTYB4-Vektor enthält hinter dem Insert eine Chitin-Bindedomäne (CBD). So entsteht

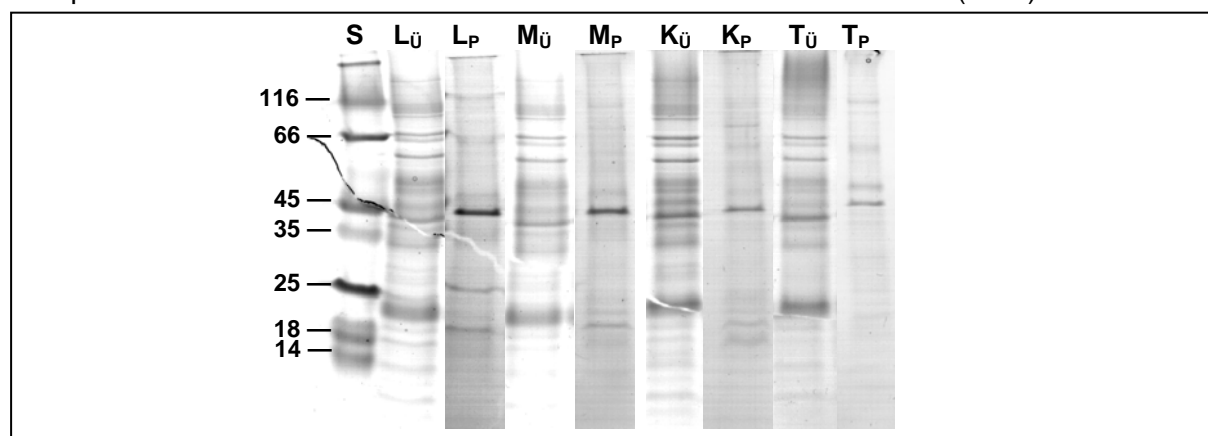


Abbildung 63: SDS-PA-Gele mit den cytoplasmatischen und membrangebundenen Protein-fractionen aus den aufgeschlossenen Zellen der LB-Amp-Expression.

Die Expression erfolgte in BL21 x CP-Zellen bei 37° C im LB-Amp-Medium. Ü = cytoplasmatische Proteinfraction, P = Membransolubilisat, S = Massenstandard #SM0431 in kDa, L = pTYB4-PLL, M = pTYB4-PLM, K = pTYB4-PLK, T = pTYB4.

bei der Expression ein Fusionsprotein, bestehend aus SBP und CBP. Als SBP-Varianten wurden SBP-PLL, SBP-PLM und SBP-PLK verwendet. Eine Aufreinigung des Fusionsproteins war über Chitin-Beads-Säulen möglich. Als Vergleich (Negativkontrolle) diente „leerer“ Vektor, der noch die vollständige, ursprüngliche mcs enthielt. Dabei wurde ein Protein bestehend aus CBD und Intein, mit einer Masse von 57 kDa erwartet. Die Anzucht der Kulturen wurde bei 37° C in LB-Amp-Medium durchgeführt. Die Induktion zur Expression erfolgte mit IPTG. 20 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet. *Inclusion bodies* waren unter dem Phasenkontrastmikroskop nicht sichtbar. Die cytoplasmatische und Membran-Fraktion wurden getrennt. Erwartet wurde Zielprotein mit einer Masse von über 90 kDa ($t_L = 94,91$ kDa, $t_M = 93,37$ kDa und $t_K = 90,66$ kDa) im Cytoplasma. Auf den PA-Gelen waren jedoch keine Banden der Zielproteine erkennbar (Abb.63). Die Aufreinigung sowohl der cytoplasmatischen Fraktion als auch des Membransolubilisats erfolgte über CBP-Säulen (siehe III 5.3.1). Auf den PA-Gelen waren weder Fusionsproteinbanden erkennbar, noch kam es zu einer kompletten Entfernung der *E. coli*-Proteine (Abb.64). Eine Säulenaufreinigung war somit nicht möglich.

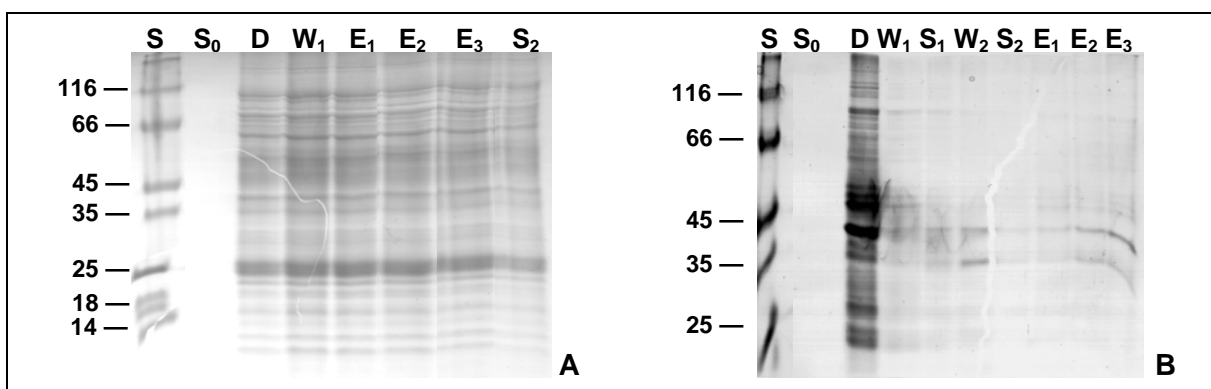


Abbildung 64: PA-Gele der Chitin-Beads-Säulenaufreinigung.

A = Säulenaufreinigung der cytoplasmatischen Proteinfraction, B = Säulenaufreinigung des Membransolubilisats, S = Massenstandard #SM0431, in kDa, S_0 = Säulenmaterial am Anfang, S_1 = Säulenmaterial vor der Aufreinigung, S_2 = Säulenmaterial nach der Aufreinigung, D = Durchfluss, W_1 = Waschfraktion 1, W_2 = Waschfraktion 2, E_1 = Eluat 1, E_2 = Eluat 2, E_3 = Eluat 3.

3.2.2 Expression von pET28c-SBP in BL21-Zellen

Der pET28c-Vektor besitzt C-terminal einen His-Tag zur späteren Proteinaufreinigung. Die erwartete Masse des durch Expression in BL21-Zellen überproduzierte Fusionsprotein (SBP-POL) sollte bei 35,54 kDa liegen. Als Negativkontrolle wurde auch wieder eine Expression mit Zellen, die reinen Vektor enthielten, durchgeführt. Die Expression wurde bei 37° C in LB-Kan-Medium durchgeführt. Ebenfalls 20 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet. *Inclusion bodies* waren unter dem Phasenkontrastmikroskop nicht sichtbar.

Sowohl in der cytoplasmatischen Proteinfraction als auch im Membransolubilisat waren auf dem PA-Gel keine Zielprotein-Banden erkennbar (Abb.65).

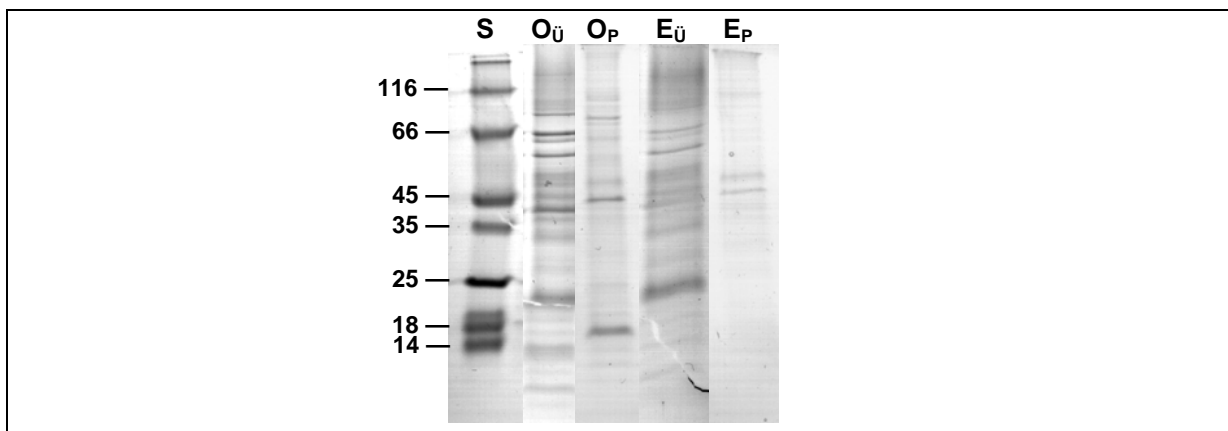


Abbildung 65: PA-Gele mit den cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteinfractionen aus den aufgeschlossenen Zellen der LB-Kan-Expression.

Die Expression erfolgte in BL21 x CP-Zellen bei 37 ° C im LB-Kan-Medium. S = Massenstandard #SM0431 in kDa, O = pET28c-POL, E = pET28c, Ü = cytoplasmatische Proteinfraction, P = Membransolubilisat.

Da diese Proteine einen His-Tag besitzen, wurde versucht mittels Western-Blot mit Penta-His-Antikörper spezifisch nach dem Protein zu suchen (Abb.66).

Auch auf dem Western-Blot war weder in den Konstrukten noch in der Vektorkontrolle SBP-Protein detektierbar. Die Positivkontrolle (TbpE), welche ebenfalls einen His-Tag besaß, war hingegen eindeutig erkennbar.

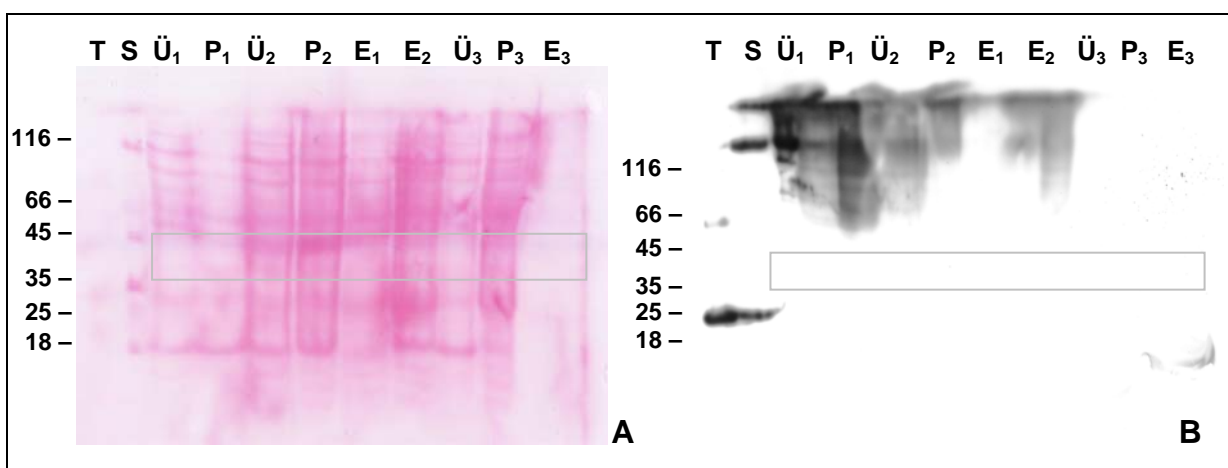


Abbildung 66: Western-Analyse mit Penta-His-Antikörper zum Nachweis von SBP-Protein mit His-Tag aus pET28c-POL-Konstrukten.

Der Kasten zeigt die ungefähre Lage des Zielproteins an. T = TbpE-Protein, S = Massenstandard #SM0431 in kDa, Ü = cytoplasmatische Proteinfraction von BL21CP x pET-POL, P = Membransolubilisat von BL21 x CP x pET-POL, E = Gesamtextrakt von BL21 x CP x pET28c, 1 – 3 = Expressionsparallelen.

3.2.3 Expression von pMAL-c2X-SBP in TB1-Zellen

Der pMAL-c2X-Vektor besitzt hinter dem eingefügten Insert das Gen *mal* E des Maltose-Binde-Proteins (MBP). Bei Expression wird ein Fusionsprotein bestehend aus SBP und MBP gebildet. Da das MBP ein sehr stabiles Protein ist, sollte hierbei eine Produktion von *inclusion bodies* vermieden werden (Maina *et al.*, 1988). Durch den pMAL-c2X-Vektor sollte cytoplasmatisches Zielprotein produziert werden. Die Aufreinigung des Fusionsproteins ist über Amylosesäulen möglich (siehe III.5.3.2). Überproduziert werden sollten mit diesem System alle SBP-Varianten (PLL, PLM, PLK und POL). Die erwartete Masse der Fusionsproteine lag dabei bei zwischen 87 und 92 kDa (PLL = 92,75 kDa, PLM = 91,21 kDa, PLK = 88,50 kDa und POL = 87,45 kDa). Die Expression erfolgte im SB-Amp-Medium, welches Glucose zur Repression der Maltose-Gene im Chromosom des *E. coli*-Stamms enthält. Während des Wachstums sank der pH-Wert ab, da die Zellen mit der zugegebenen Glucose gärten. Insofern mussten die Zellen 3 h nach Induktion geerntet werden. Im Phasenkontrastmikroskop waren keine *inclusion bodies* erkennbar. Als Kontrolle wurde pMAL-c2X-Vektor ohne Insert verwendet. Hier wurde bei Expression eine Überproduktion des MBP mit dem β -Gal- α -Fragment mit einer Gesamtmasse von 50,84 kDa erwartet. Mittels SDS-PAGE wurden sowohl die cytoplasmatische als auch die membrangebundene Proteinfraction aufgetrennt (Abb.67). Als Vergleich wurde MBP (NEB) mit aufgetragen. Dieses gereinigte Protein enthält kein β -Gal- α -Fragment, so dass hier nur eine Masse von 42,84 kDa zu sehen war (Abb.67).

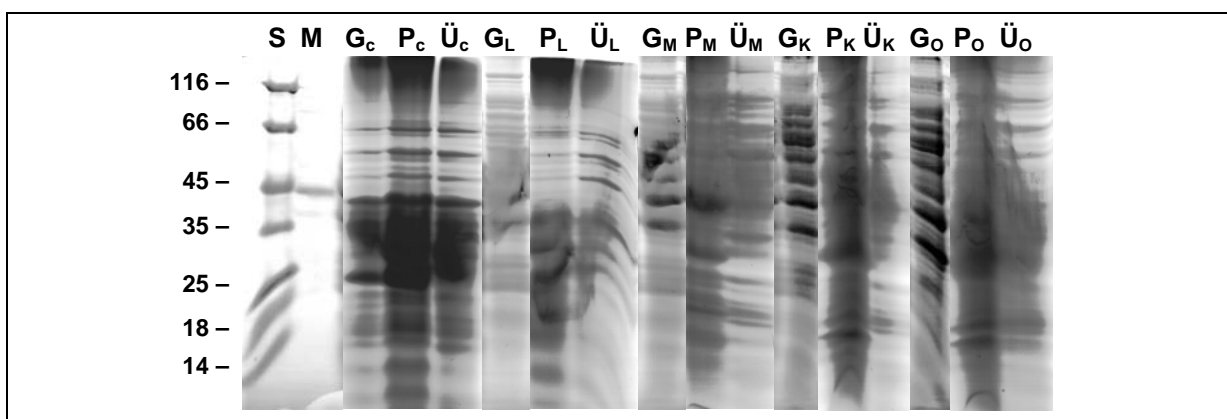


Abbildung 67: PA-Gele mit den cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteinfractionen aus den aufgeschlossenen Zellen der LB-Amp-Expression.

Die Expression erfolgte in TB1 x CP-Zellen bei 37 ° C im LB-Amp-Medium. S = Massenstandard #SM0431 in kDa, M = Maltose-Binde-Protein (NEB), G = Gesamtextrakt, Ü = cytoplasmatische Proteinfractionen, P = Membransolubilisat, c = cMAL-c2X, L = pMAL-c2X-PLL, M = pMAL-c2X-PLM, K = pMAL-c2X-PLK, O = pMAL-c2X-POL.

Auf den PA-Gelen war in keiner der Fraktionen Zielprotein erkennbar. Auch in der Vektorkontrolle war kein MBP sichtbar. Nach Säulenaufreinigung (siehe III 5.3.2) der

cytoplasmatischen Proteinfraction von pMAL-c2X-POL wurden die Fraktionen elektro-

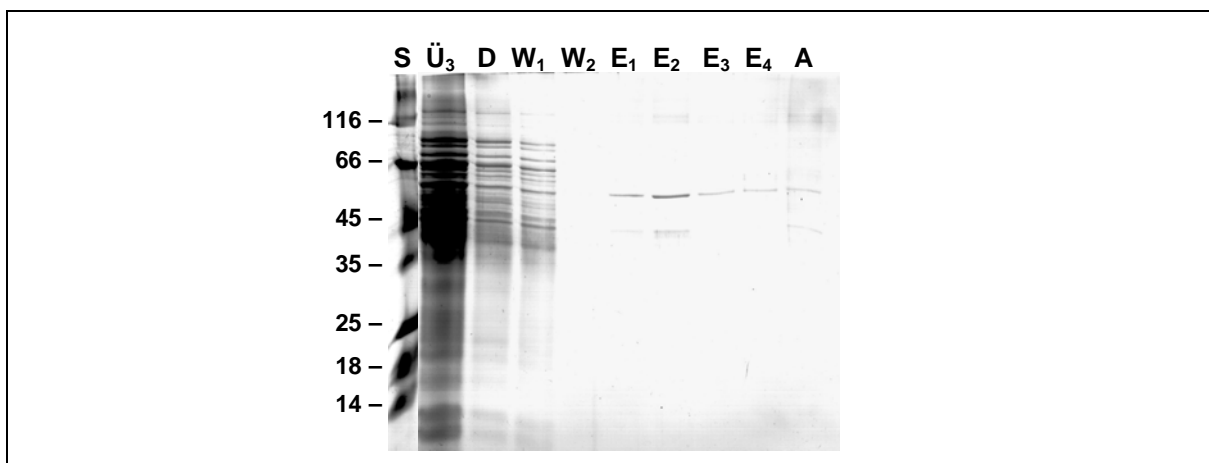


Abbildung 68: SDS-PAGE der Amylose-Säulenaufreinigung der cytoplasmatischen Proteinfraction aus TB1 x CP x pMAL-c2X-POL.

S = Massenstandard #SM0431 in kDa, Ü₃ = Fraktion vor der Säulenaufreinigung, D = Durchfluss, W₁₋₂ = Waschfraktionen, E₁₋₄ = Elutionsfraktionen, A = Säulenmaterial nach Säulenaufreinigung.

phoretisch aufgetrennt (Abb.68). Auch hier zeigte sich kein SBP-Fusionsprotein. Jedoch waren in den Elutionsfraktionen (E₁ – E₄) Banden einer Masse von etwa 50 kDa zu erkennen, bei denen es sich um MBP handeln könnte (Abb.68).

Die Überprüfung mittels Western-Blot wurde mit MBP-Antikörper durchgeführt, welcher spezifisch gegen den Maltose-Binde-Protein-Teil des Fusionsproteins reagiert (Abb.69). Während die MBP-Positivkontrolle (NEB) detektiert werden konnte, war in den cytoplasmatischen Proteinfractionen kein SBP-MBP-Fusionsprotein zu sehen.

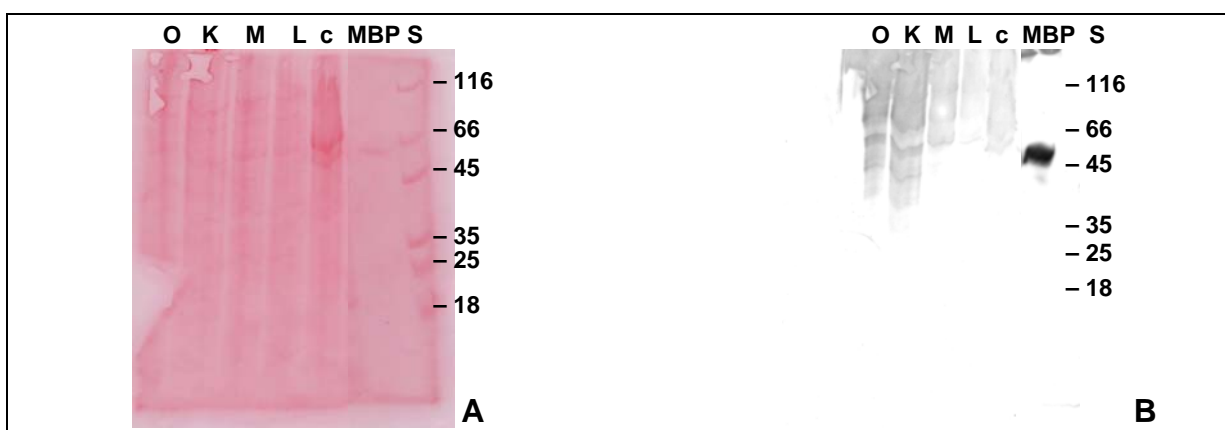


Abbildung 69: Western-Analyse zur Detektion von SBP-MBP-Fusionsprotein mit MBP-Antikörper.

A. Ponceau-Rot gefärbte PVDF-Membran, B. Western-Blot; S = Massenstandard #SM0431 in kDa, c = TB1 x CP x pMAL-c2X, L = TB1 x CP x pMAL-c2X-PLL, M = TB1 x CP x pMAL-c2X-PLM, K = TB1 x CP x pMAL-c2X-PLK, O = TB1 x CP x pMAL-c2X-POL, MBP = Maltose-Binde-Protein (NEB).

3.2.4 Expression von pMAL-p2X-SBP in TB1-Zellen

Der pMAL-p2X-Vektor besitzt hinter dem eingefügten Insert das Gen *mal* E des Maltose-Binde-Proteins (MBP). Bei Expression wird ein Fusionsprotein bestehend aus SBP und MBP gebildet. Da das MBP ein sehr stabiles Protein ist, sollte hierbei eine Produktion von *inclusion bodies* vermieden werden (Maina *et al.*, 1988). Vor dem *mal* E-Gen liegt in diesem Vektor eine Signalsequenz zur Ausschleusung des Fusionsproteins in das Periplasma. Die erwartete Masse der überproduzierten Fusionsproteine lag zwischen 78 und 84 kDa (PLL = 84,39 kDa, PLM = 82,85 kDa, PLK = 80,14 kDa und POL = 78,09 kDa). Als Vektorkontrolle wurde wieder der leere Vektor ohne Insert verwendet. Dabei wurde eine Überproduktion von MBP (42,48 kDa) erwartet.

Auch hier erfolgte die Expression im SB-Amp-Medium, welches Glucose zur Repression der Maltose-Gene im Chromosom des *E. coli*-Stamms enthält. Die Zellen wurden 3 h nach Induktion geerntet, da durch die Zugabe der Glucose der pH-Wert während des Wachstums absank. Im Phasenkontrastmikroskop waren keine *inclusion bodies* erkennbar. Mittels SDS-PAGE wurden sowohl die cytoplasmatische als auch die periplasmatische und membran-gebundene Proteinfraction aufgetrennt (Abb.70).

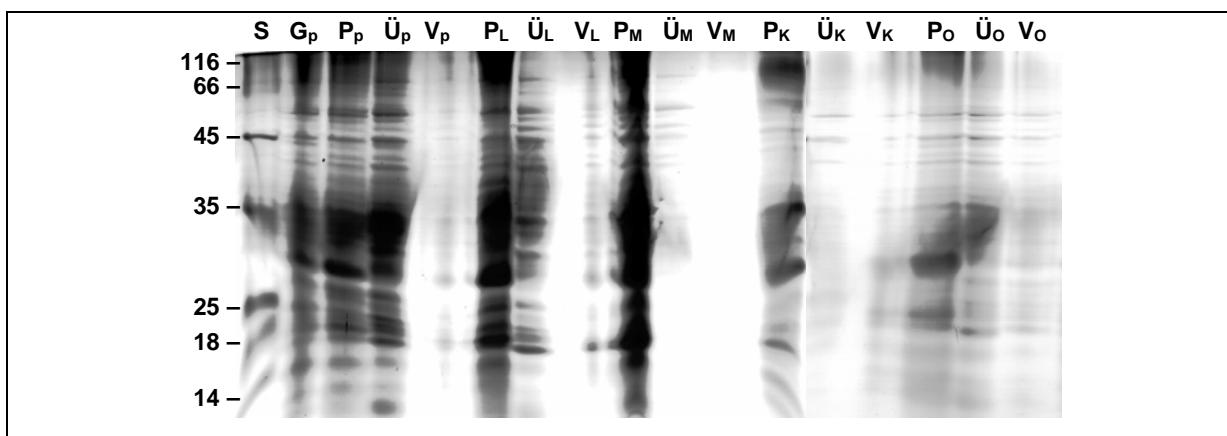


Abbildung 70: PA-Gele der cytoplasmatischen, periplasmatischen und membrangebundenen Proteinfractionen nach Expression der Zellen.

S = Massenstandard #SM0431 in kDa, p = TB1 x CP x pMAL-p2X, L = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLL, M = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLM, K = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLK, O = TB1 x CP x pMAL-p2X-POL, G = Gesamtextrakt, V = periplasmatische Proteinfraction, Ü = cytoplasmatische Proteinfraction, P = Membransolubilisat.

Auf den PA-Gelen war in keiner der Fraktionen Zielprotein erkennbar. Auch bei der Vektorkontrolle war kein MBP detektierbar.

Durch Western-Analysen sollte mittels MBP-Antikörper nach Zielprotein gesucht werden (Abb.71).

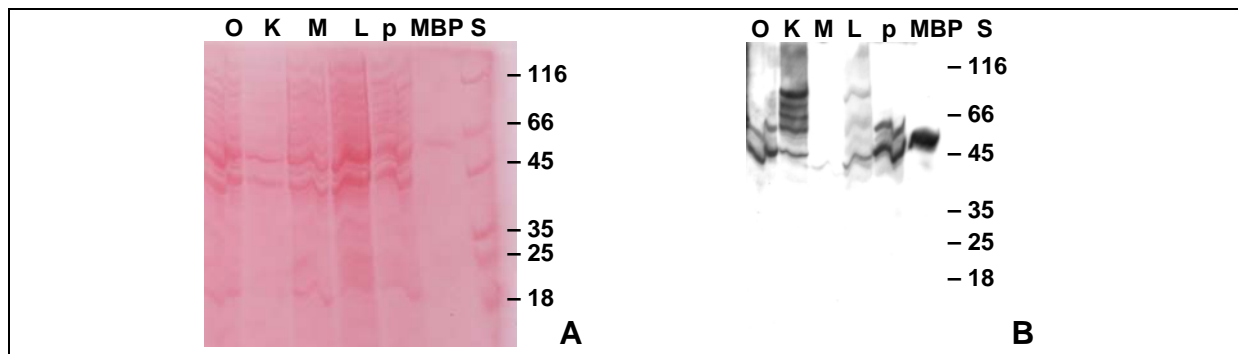


Abbildung 71: Western-Analyse zur Detektion von SBP-MBP-Fusionsprotein mit MBP-Antikörper.

A. Ponceau-Rot gefärbte PVDF-Membran, B. Western-Blot; S = Massenstandard #SM0431 in kDa, p = TB1 x CP x pMAL-p2X, L = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLL, M = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLM, K = TB1 x CP x pMAL-p2X-PLK, O = TB1 x CP x pMAL-p2X-POL, MBP = Maltose-Binde-Protein (NEB).

Eine Detektion des mit aufgetragenen MBP (NEB) mit dem MBP-Antikörper war möglich. In der Vektorkontrolle war eine 42 kDa-Bande auf dem Western-Blot zu detektieren, bei der es sich entweder um SBP oder um *E. coli*-Hintergrund handeln könnte. In den periplasmatischen Fraktionen der aufgeschlossenen Zellen der Expression war kein MBP-Fusionsprotein erkennbar (Abb.71). Jedoch war auch hier eine 42 kDa-Bande detektierbar, bei der es sich ebenfalls um das reine MBP (ohne fusioniertes SBP) handeln könnte.

4 Funktionstests

Um die Funktion des SBP zu analysieren, sollte versucht werden eine Bindung von SBP an Schwefel zu detektieren. Dazu sollte einerseits SBP aus dem Gesamtproteinextrakt nach Expression von *E. coli* TB1 x CP x cMAL-POL verwendet werden. Da jedoch Gesamtproteinextrakt der *E. coli*-Kultur laut Western-Analyse kein SBP vorhanden war (siehe 3.2.3), wurde dies dann als Negativkontrolle gewertet.

Andererseits wurde der mit Triton X-100 aus dem Schwefelsediment von *Acidianus ambivalens* isolierte SBP-Überstand (SBP) untersucht (siehe Abb.47). Der Überstand wurde zunächst gegen 1:1000 verdünnten EF.B-Puffer dialysiert um das Triton, das zur Lösung der Bindung vom Schwefel geführt hat, zu entfernen.

Beide Proteinlösungen wurden mit Schwefel inkubiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.72). Während beim Funktionstest mit dem Gesamtproteinextrakt von *E. coli* viele Proteine unspezifisch am Schwefel hängen blieben, war beim Funktionstest mit der SBP-Lösung kein Protein zu isolieren (Abb.72).

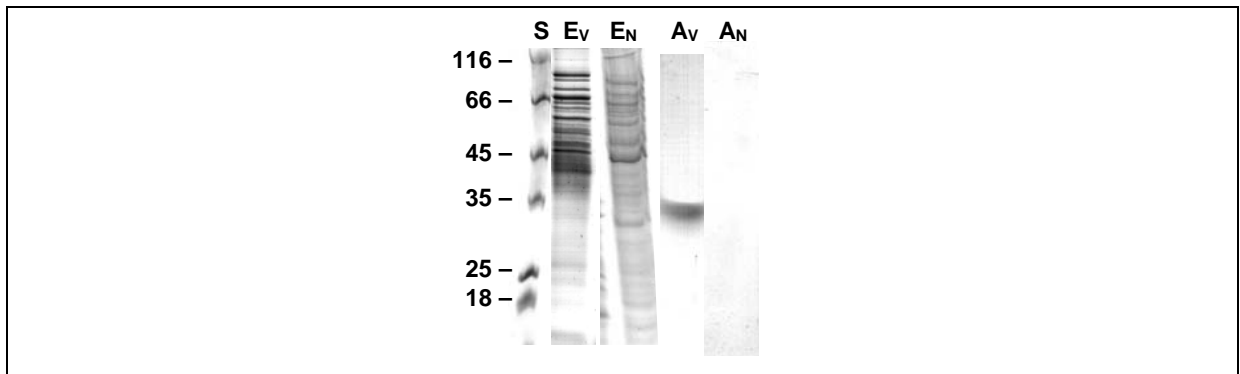


Abbildung 72: PA-Gel des Funktionstest.

Aufgetragen sind jeweils die Fraktionen vor (V) und nach dem Funktionstest (N). S = Massenstandard #SM0431 in kDa, E = Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* TB1 x CP x pMAL-c2X-POL, A = SBP-Lösung aus dem Schwefelsediment nach aeroben Wachstum mit Schwefel.

5 Kopienzahl des *sbp*-Gens

Die Gesamt-DNA von *A. ambivalens* wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I, *Hind* III, *Xho* I, *Nco* I, *Xba* I, *Nhe* I, *Bam*H I, *Bgl* II, *Bcu* I bzw. *Ssp* I restringiert und elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden ungeschnittene Gesamt-DNA sowie *sbp*-Amplifikat (POL) aufgetragen. Die Southern-Analyse erfolgte mittels einer gegen *sbp*-gerichteten DNA-Sonde (Abb.73).

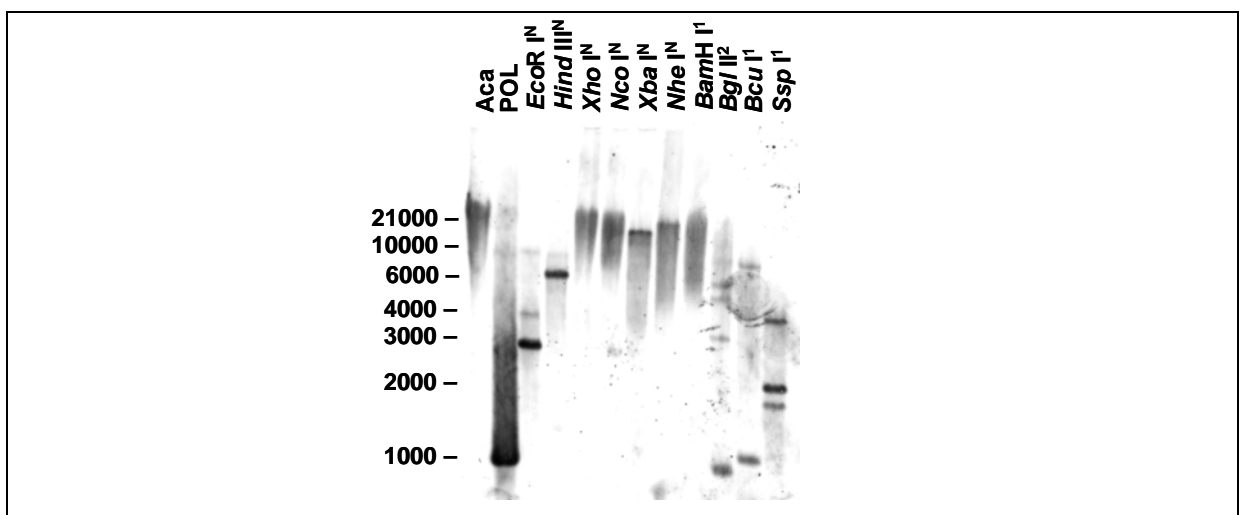


Abbildung 73: Southern-Analyse gegen *sbp*.

Aca = genomische DNA von *Acidianus*, POL = *sbp*-Amplifikat, N = Restriktionsenzym schneidet nicht im *sbp*, 1 = Restriktionsenzym schneidet einmal im *sbp*, 2 = Restriktionsenzym schneidet zweimal im *sbp*; als Größenstandard wurden #SM0331 und λ -Eco-Hind (Fermentas) verwendet.

Bei den Enzymen, welche nicht im *sbp* schneiden (*EcoR* I, *Hind* III, *Xho* I, *Nco* I, *Xba* I & *Nhe* I) waren zwischen 1 und 3 Banden auf dem Southern Blot zu detektieren (Abb.73). Bei der Restriktion mit *Bgl* II, welches zweimal im *sbp* schneidet, waren 5 Banden sichtbar, bei den Enzymen, die einmal im *sbp* schneiden (*Bam*H I, *Bcu* I & *Ssp* I) zwischen 1 und 3 Banden. Somit ergab sich eine dreifache Kopienzahl des *sbp* im Genom von *Acidianus ambivalens*.

6 RNA-Analysen

6.1 Nachweis von *sbp*-RNA mittels Northern-Analyse

Das Schwefel-Binde-Protein wurde nur in Filtraten des Schwefelsedimentes aus aerobem Kulturwachstum von *Acidianus* gefunden (siehe Abb.44). Mittels Northern-Analyse sollte überprüft werden, ob dies auch auf RNA-Ebene der Fall ist (Abb.74). Dabei wurde aus je 3 l *Acidianus*-Kultur zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h RNA isoliert (siehe III.6.1).

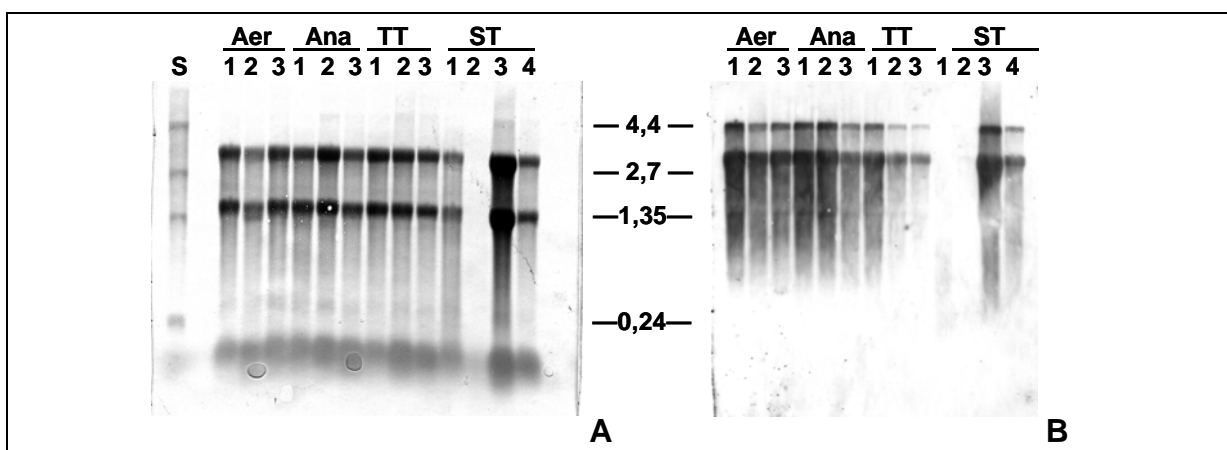


Abbildung 74: Detektion von *sbp*-RNA aus *Acidianus ambivalens* mittels einer *sbp*-DNA-Sonde durch Northern-Analyse.

A. Methyleneblau gefärbte Membran, B. Northern-Blot. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg RNA pro Spur. S = RNA-Größenstandard in kb, AER = RNA aus aerob mit Schwefel gewachsenen Kulturen, ANA = RNA aus anaerob mit Schwefel gewachsenen Kulturen, TT = RNA aus aerob mit Tetrathionat gewachsenen Kulturen, ST = RNA aus aerob mit Schwefel und Tetrathionat gewachsenen Kulturen, 2 = 24 h, 4 = 48 h, 7 = 72 h.

Sbp-RNA konnte in fast allen entnommenen Proben detektiert werden. Die Größe lag bei ca. 4 kb. Die zweite detektierte Bande lag genau auf der Höhe der 23S rRNA, so dass es sich hier um eine Hintergrunddetektion von 23S rRNA handelt (Abb.74). Bei der RNA aus aerob mit Schwefel gewachsenen Kulturen, wurden zu allen Zeitpunkten im Verhältnis vom Blot zur Methyleneblaufärbung der Membran die gleichen Bandenstärken gefunden.

Bei der RNA aus anaerob mit Schwefel gewachsenen Kulturen wurde die Bandenstärke leicht schwächer, je mehr sich die Kultur, aus der die RNA isoliert wurde, im stationären Stadium befand. Derselbe Effekt, wenn auch in viel stärkeren Ausmaß konnte bei der RNA aus aerob mit Tetrathionat gewachsenen Kulturen beobachtet werden. Bei Wachstum der Kulturen mit Schwefel und Tetrathionat war zum Zeitpunkt 24 h keine *sbp*-RNA detektierbar, wohl aber zu den Zeitpunkten 72 und 96 h. Ob zum Zeitpunkt 48 h auch *sbp*-RNA gebildet wurde, ist nicht feststellbar, da hier keine RNA isoliert werden konnte.

6.2 Primer-Extension

Mittels Primerextension sollte der *sbp*-Transkriptionsstart bestimmt werden (siehe III.6.3). Als Oligonukleotid wurde *sbp*_primerext verwendet. Als Vergleich diente die Sequenzierung des pBluescript II SK(+) -Vektors mit dem M13 reverse Primer (zur Verfügung gestellt von Ole Rigbers). Ausgehend vom Primerextension-Oligonukleotid wurde in der Sequenz mit

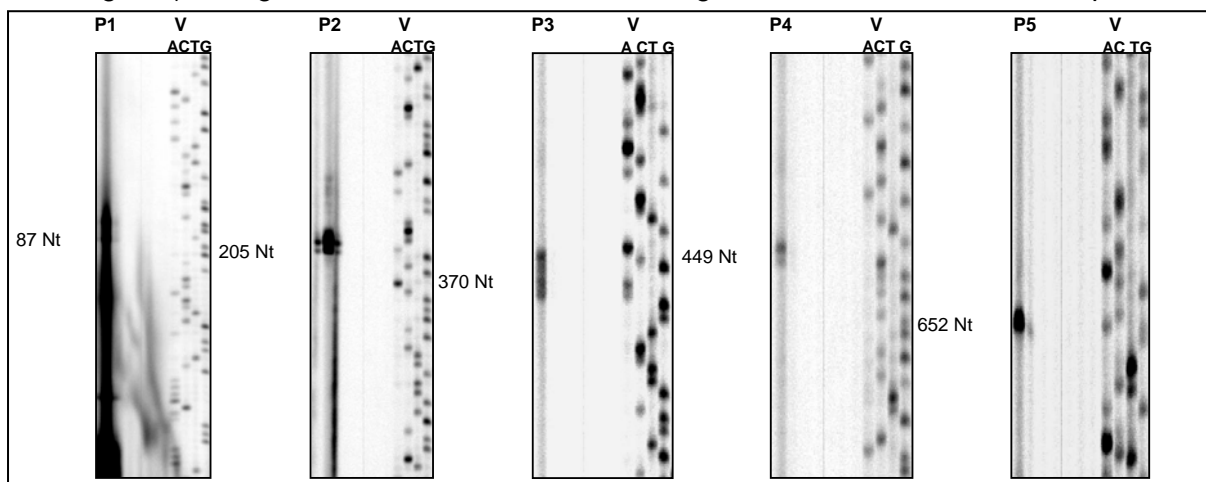


Abbildung 75: Sequenzgelausschnitten mit aufgetragenen Primerextensionsansatz und Vergleichssequenz.

Die Auftrennung des Primerextension-Reaktionsansatzes über ein Sequenzgel ergab 5 Banden (P1 – P5). Die daraus resultierende Länge ist jeweils links daneben in Nukleotiden (Nt) angegeben. P = Primerextension mit *sbp* (nach 48 stündigem aerobem Wachstum der Kulturen), V = Sequenz des pBluescript II SK(+) Vektors.

den durch die Primerextension erhaltenen Nukleotidlängen der Transkriptionsstart des *sbp* gesucht (Abb.76). P2 galt dabei als der wahrscheinlichste Startpunkt, da auf dem Sequenzgel diese Bande am deutlichsten zu detektieren war (siehe Abb.75). Während bei P1 der Start des *sbp* im *sbp* selber beginnen würde, liegt P5 außerhalb des contigs. Über P5 kann keine Aussage getroffen werden, da die Sequenz vor dem contig nicht bekannt ist. Die Banden P3 – P4 liegen im contig, jedoch sind sie nicht so stark und eindeutig, wie P2. P2 liegt 27 Nt stromabwärts des TATA-Box-Motivs für PLM und ist somit der wahrscheinlichste Transkriptionsstart (Abb.76). Eine Überprüfung der möglichen BR-Elemente zeigte, dass nur das BRE vor der TATA-Box für PLM genau –34 stromauf vom bestimmten Transkriptionsstart (P2) entfernt lag (Abb.76).

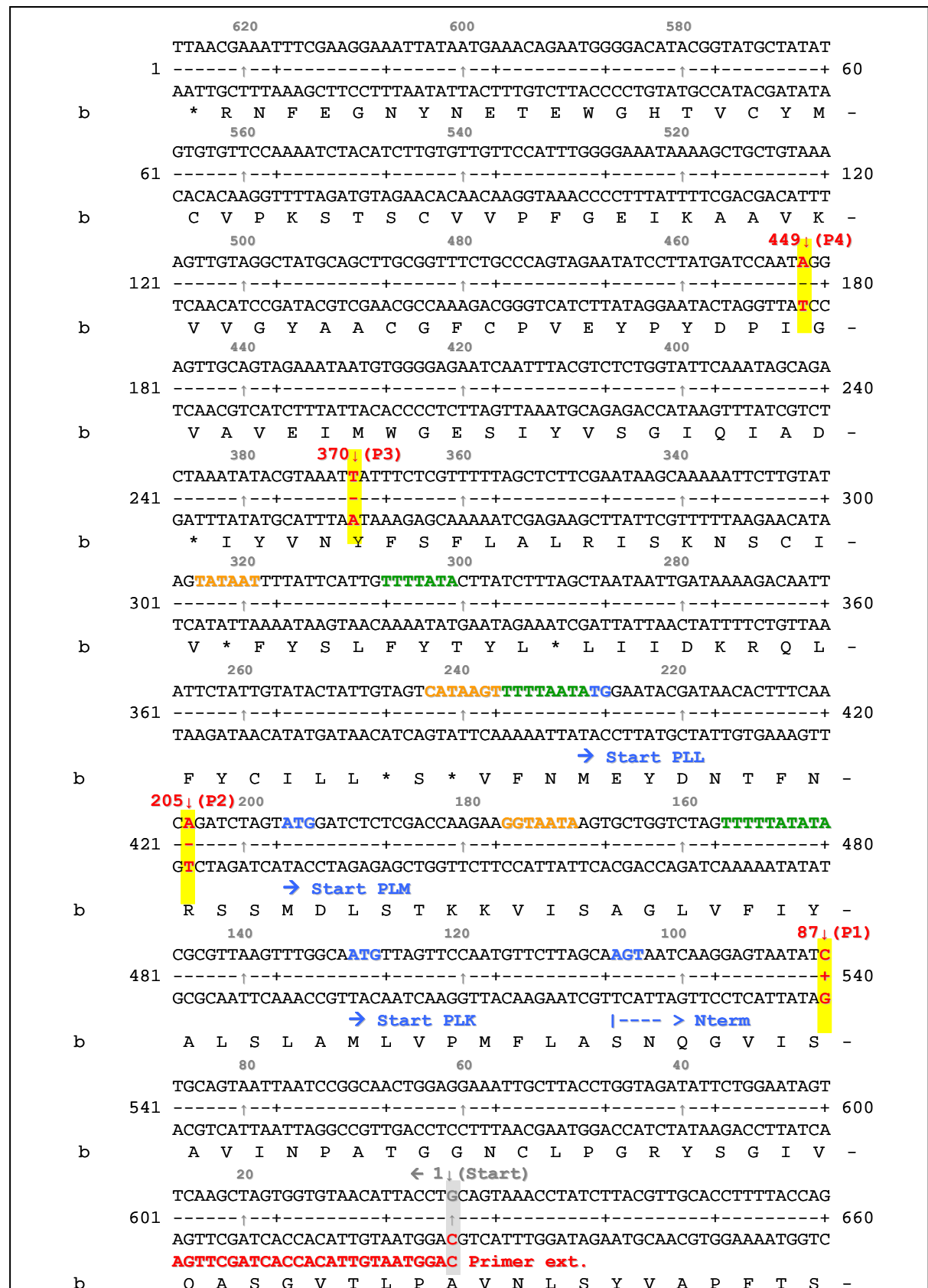


Abbildung 76: Teil der Nukleotidsequenz und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz des contig 275 mit dem darin enthaltenen Gen *sbp*.

Rot = Extensionprimer (Primer ext.); **Rot** = jeweiligen durch Primerextension festgestellte Transkriptionsstartpunkte; **Blau** = mögliche Startpunkte des *sbp* mit bzw. ohne *leader*-Sequenz. **Grün** = TATA-Box-Motive, **orange** = mögliche BR-Elemente, **graue Zahlen** = Entfernung vom Extensionsprimer in Nukleotiden.

V Diskussion

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Schwefelmobilisierung des hyperthermoacidophilen Crenarchaeons *Acidianus ambivalens* durchgeführt. *Acidianus* kann aerob sowie anaerob mit elementarem Schwefel wachsen. Während bei der anaeroben Schwefelatmung die Bindung und Umsetzung des Schwefel außerhalb der Zelle durch das membrangebundene Enzym Schwefelreduktase stattfindet (Laska, 2003), ist beim aeroben Schwefelmetabolismus das initiale Enzym, die Schwefel-Oxygenase-Reduktase (SOR) im Cytoplasma lokalisiert (Kletzin *et al.*, 2004). Dadurch muss der extrazellulär vorhandene elementare Schwefel mobilisiert und in die Zelle transportiert werden. Dazu gab es bis jetzt keine Untersuchungen.

So sollten in dieser Arbeit die extrazellulären Vorgänge des aeroben Schwefelmetabolismus in Bezug auf entstehende Schwefelverbindungen und beteiligte sekretierte Proteine geklärt werden.

1 Schwefelverbindungen

Damit Organismen mit elementarem Schwefel wachsen können muss dieser aktiviert werden. Diese Schwefelmobilisierung ist bis jetzt nur bei wenigen Organismen bekannt. Zumeist werden anorganische Schwefelverbindungen aus dem hydrophoben elementaren Schwefel gebildet, wie beispielsweise Polysulfide (*Thermococcus tadjuricus*) oder höhere Polythionate (*Acidithiobacillus ferrooxidans*; Ritzau *et al.*, 1993; Steudel *et al.*, 1987). Häufig jedoch lagern insbesondere phototrophe Bakterien den Schwefel in so genannten Schwefelkügelchen ab (Guerrero, *et al.*, 1984, 1985; Hageage *et al.*, 1970; Mas & van Gemerden, 1987; Mas *et al.*, 1985 und Steudel *et al.*, 1987; Steudel, 1985, 1989). Diese Schwefelkügelchen können dabei entweder periplasmatisch (*Thioalkalivibrio*), cytoplasmatisch (*Chlorobiaceae*) oder in Vesikeln außerhalb der Zelle (*Chromatiaceae*) gelagert werden (Sorokin *et al.*, 1999; Prange *et al.*, 2002a). Die Zusammensetzung der Schwefelkügelchen ist dabei noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sie entweder aus Cyclooctaschwefel (*Beggiatoa alba* und *Thiomargarita namibiensis*), polymerischen Schwefel (*Allochromatium vinosum*), Polythionaten, Thiosulfat oder Sulfit (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) bestehen (Cheng *et al.*, 1999; George *et al.*, 2002; Prange *et al.*, 2002a; Shrihari *et al.*, 1993).

Bei *Acidianus ambivalens* ist bisher nicht bekannt, wie der elementare Schwefel mobilisiert und in welcher Form er in die Zelle transportiert wird. Eine Produktion von Polysulfiden ist nicht möglich, da Polysulfid bei den hyperthermoacidophilen Bedingungen in Schwefel und Sulfid zerfällt (Tab.1; Schauder & Kröger, 1993). Polythionate sind hingegen unter den

gegebenen Bedingungen stabil. Sollten beim aeroben Schwefelstoffwechsel zwischen dem elementaren Schwefel im Kulturüberstand und der Aufnahme in die Zelle Schwefelverbindungen entstehen, müsste die Zelle in der Lage sein, mit dieser Verbindung als alternative Schwefelquelle zu wachsen. Durch die Anzucht mit alternativen Schwefelquellen (Tetrathionat und Thiosulfat), sollte untersucht werden, ob der Organismus in der Lage ist, damit zu wachsen. Wachstum mit Tetrathionat ist bei vielen Organismen bekannt (siehe Tab.2). Dabei wird von Enterobacteriaceen (bsp. *Salmonella*, *Citrobacter* und *Proteus*) anaerobe Tetrathionat-Atmung durchgeführt (Hensel *et al.*, 1999; Hinsley & Berks, 2002; Richard, 1977; Barrett and Clark, 1987). Weiterhin ist der Abbau von Tetrathionat lithotroph durch verschiedene *Acidithiobacillus*-Arten oder phototroph durch *Chlorobiaceae* möglich (Tab.2; Friedrich, 1998; Kamimura *et al.*, 2002). Einzig bekanntes Archaeon, welches Tetrathionat verwertet, ist *Acidianus brierleyi* (Emmel, *et al.*, 1986). Dieses Archaeon kann weiterhin auch mit Thiosulfat wachsen (Sun *et al.*, 2003). Auch Thiosulfat wird als Schwefelquelle von vielen Organismen zum lithotrophen, phototrophen oder heterotrophen Wachstum benutzt (Tab.18).

Acidianus ambivalens wuchs mit Tetrathionat als alternative Schwefelquelle an (TT-Kulturen), eine Kultivierung mit Thiosulfat (TS-Kulturen) war hingegen nicht möglich (siehe Abb.16). Beim Wachstum mit Schwefel sollte die Zellzahl langsam ansteigen, da der wasserunlösliche Schwefel schwer zu verwerten sein müsste und als Eingangsreaktion für den Stoffwechsel zunächst eine Mobilisierung des Schwefels nötig wäre. Beim Tetrathionat hingegen sollte keine Mobilisierung notwendig sein und somit die Zellzahl schneller ansteigen. Beim Vergleich der Kultivierung mit Tetrathionat bzw. mit Schwefel stieg jedoch während der ersten 24 h die Zellzahl der Tetrathionat-Kulturen langsamer als die der Schwefel-Kulturen. Da jedoch zum Zeitpunkt 24 h noch keine Abnahme der Tetrathionat-Konzentration im Kulturüberstand zu bemerken war (siehe Abb.24), scheint auch hier erst eine Aktivierung des Substrates notwendig zu sein. Nach 48 h zeigten die Tetrathionat-Kulturen gegenüber den Schwefel-Kulturen eine stark erhöhte Zelldichte, die mit einer Abnahme der Tetrathionat-Konzentration im Kulturüberstand einherging. Nach der Aktivierung beider Substrate scheint somit Tetrathionat leichter verwertbar zu sein als Schwefel.

Beim Vergleich der Zellzahlen zeigte sich, dass die Kulturen mit Tetrathionat und Schwefel (ST-Kulturen) den höchsten Zelltiter besaßen. Bekamen die Zellen erst nur Tetrathionat und nach 48 h zusätzlich Schwefel (TA-Kulturen), so zeigten sie zu Beginn ein langsames Wachstum, ähnlich den TT-Kulturen. Die Zellzahl stieg allerdings nach Zugabe von Schwefel nochmals an.

Tabelle 18: Übersicht über Thiosulfat-verwertende Organismen

(Alfredsson *et al.*, 1986; Aminuddin & Nicholas, 1974; Aragno, 1991; Aragno & Schlegel, 1978; Auling *et al.*, 1978; Bonjour & Aragno, 1986; Bowen *et al.*, 1966; Chandra & Friedrich, 1986; Charles & Suzuki, 1966; Dahl, 1996; Das & Mishra, 1996; Das *et al.*, 1996; Dolata *et al.*, 1993; Emmel *et al.*, 1986; Friedrich, 1998; Friedrich & Mitrenga, 1981; Fukumori & Yamanaka, 1979; Hallberg & Lindström, 1994; 1996; Huber *et al.*, 1992; Hudson *et al.*, 1988; Imhoff, 1989; Kelly & Harrison, 1989; Kodama, 1969; Lu & Kelly, 1983, 1984, 1988; Meulenber *et al.*, 1992, 1993; Nakamura *et al.*, 1995; Petushkova & Ivanovsky, 1976; Schedel *et al.*, 1979; Schedel & Trüper, 1979; Schmitt *et al.*, 1981; Shahak *et al.*, 1992; Shima & Suzuki, 1993; Shooner *et al.*, 1996; Sugio *et al.*, 1989, 1992a, 1992b; Toghrol & Southerland, 1983; Trüper & Fischer, 1982; Wahlund *et al.*, 1991; Wiegel *et al.*, 1978; Whited & Tuttle, 1983; Wodara *et al.*, 1994).

Organismus	Metabolismus	pH	T (° C)
<i>Acidianus brierleyi</i>	obligat lithotroph	1,8	70
<i>Acidithiobacillus acidophilus</i>	fakultativ lithotroph	2,5	30
<i>Acidithiobacillus caldus</i> KU	obligat lithotroph	2,5	45
<i>Acidithiobacillus denitrificans</i>	obligat lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus neapolitanus</i>	obligat lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus novellus</i>	fakultativ lithotroph	7,0	30
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	obligat lithotroph	2,5	30
<i>Acidithiobacillus perometabolis</i>	fakultativ lithotroph	6,0	30 – 35
<i>Acidithiobacillus tepidarius</i>	obligat lithotroph	7,0	44
<i>Acidithiobacillus thermosulfatus</i>	fakultativ lithotroph	5,4	51
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	obligat lithotroph	2,5	30
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	fakultativ lithotroph	8,0	30
<i>Aquifex pyrophilus</i>	obligat lithotroph	6,8	85
<i>Bacillus schlegelii</i>	fakultativ lithotroph	7,0	59-72
<i>Bosea thiooxidans</i>	fakultativ lithotroph	7,4	30
<i>Chlorobium limicola</i> f. sp. <i>thiosulfatophilum</i>	obligat phototroph	7,0	30
<i>Chlorobium tepidum</i>	obligat phototroph	7,2	48
<i>Chlorobium vinosum</i>	obligat phototroph	7,0	30-35
<i>Ectothiorhodospira shapovnikovii</i>	fakultativ phototroph	8,0	30-35
<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>	obligat lithotroph	3,5	65
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	obligat lithotroph	7,0	70
<i>Paracoccus denitrificans</i>	fakultativ lithotroph	8,0	30
<i>Paracoccus versutus</i>	fakultativ lithotroph	8,0	30
<i>Pseudomonas pseudoflava</i> GA3	fakultativ lithotroph	8,0	30
mariner Pseudomonaden-Stamm 16B	heterotroph	7,0	30
<i>Rhodobacter sulfidophilus</i>	obligat phototroph	7,0	30
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	fakultativ phototroph	7,3	20-35
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> GZ29	fakultativ lithotroph	8,0	30

Durch colorimetrische Gehaltsbestimmungen (GHB) wurden die Konzentrationen von Schwefel und den anorganischen Schwefelverbindungen (ASV) Tetrathionat, Thiosulfat, Trithionat, Sulfid, Sulfit und Sulfat in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Die Sulfat- und die Schwefelgehaltsbestimmungen waren dabei nur bedingt zu werten. Bei beiden Konzentrationsbestimmungen wird bei Zugabe des Reaktionspuffers ein Niederschlag gebildet, der photometrisch gemessen wird. Da dieser Niederschlag sehr schnell absinkt, ist eine homogene Verteilung in der Küvette während der Messung schwierig und die erhaltenen Absorptionswerte sind sehr ungenau.

Beim Wachstum der Kulturen mit Schwefel war sowohl in der Kultur, als auch im Kulturüberstand ein Anstieg des Sulfat-Gehaltes zu bemerken, der in den Mediumskontrollen nicht vorkam. Ein Anstieg von Schwefelverbindungen im Kulturüberstand, könnte ein Hinweis auf eine mögliche Zwischenverbindung bei der Schwefelmobilisierung sein. Da Sulfat das Endprodukt der Zelle ist, wurde ein Sulfatanstieg in den Kulturen jedoch erwartet. Erhöhte Werte von Tetrathionat, Trithionat oder Thiosulfat wurden nicht gemessen. Weiterhin wurde eine leichte Abnahme des Schwefelgehaltes gemessen. Die gravimetrische Überprüfung bestätigte einen Schwefelverbrauch von 7% (siehe Tab.12). Dies sind umgerechnet 0,035 g Schwefel, die von durchschnittlich $1,04 \times 10^{10}$ Zellen im Kolben ($3,37 \times 10^{-12}$ g Schwefel pro Zelle) in 72 h verbraucht wurden. Dies entspricht einer Konzentration von 21,83 mM Schwefel. Außerdem wurde bei den GHB-Messungen der Kultur ein Anstieg der Sulfid-Konzentration gemessen, der auf das von der SOR gebildete Sulfid zurückzuführen war.

Auch auf der Dünnschichtchromatographieplatte waren weder bei der Mediumskontrolle noch beim Kulturüberstand Schwefelverbindungen detektierbar. Ob dennoch Schwefelverbindungen entstehen, kann nicht mit 100%iger Sicherheit ausgeschlossen werden, da nicht sichergestellt ist, dass alle Schwefelverbindungen durch Dünnschichtchromatographie (DC) detektiert werden konnten. Man kann nur mit Gewissheit sagen, dass die getesteten Schwefelverbindungen keine Rolle bei der Schwefelmobilisierung spielen.

Die ASV-Gehalte sahen beim Wachstum der Kulturen mit Tetrathionat gänzlich anders als beim Wachstum mit Schwefel aus (siehe Abb. 24 – 25). So war, wie erwartet ein Verbrauch von Tetrathionat zu erkennen, der in keiner Mediumskontrolle vorkam. Diese Abnahme konnte auch mit Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Weiterhin war ein zeitweiser Anstieg der Thiosulfatkonzentration zu verzeichnen. Ein Anstieg der Thiosulfatkonzentration war jedoch auch in den Mediumskontrollen messbar. Bei der Kultur jedoch nahm nach 48 h der Thiosulfat-Gehalt wieder ab, was bei den Mediumskontrollen nicht der Fall war. Die Thiosulfat-Konzentrationen waren jedoch nicht auf den DC-Platten zu sehen. Vielmehr war dort ein zeitweiser Anstieg von Trithionat zu sehen. Trithionat wurde ebenfalls in den Mediumskontrollen und dem Kulturüberstand gemessen, aber in weitaus geringeren Konzentrationen als Thiosulfat. Eine Möglichkeit der fehlenden Thiosulfat-Banden auf den DC-Platten wäre, dass bei der Cyanolyse, die Konzentrationen von Tetrathionat, Thiosulfat und Trithionat nebeneinander bestimmt werden. Die Thiosulfat- und Trithionat-Konzentrationen werden dabei durch Abzüge von gemessenen Mischwerten der drei Verbindungen bestimmt. So wäre es möglich, dass dabei eine Ungenauigkeit zwischen den Thiosulfat- und den Trithionat-Konzentrationen entstehen kann. Eine Möglichkeit zur Überprüfung wäre eine Thiosulfatgehaltsbestimmung mit Methylblau (Pachmeyer, 1960).

Der Abbau des Trithionates war sowohl in den Mediumskontrollen, als auch im Kulturüberstand zu sehen. Dabei handelt es sich also höchstwahrscheinlich um eine Spontanreaktion. Trotzdem wäre es eine Überprüfung wert, zu testen, ob die Kultur in der Lage wäre auch Trithionat als Schwefelquelle zu verwerten. Problem hierbei ist, dass Trithionat nicht käuflich zu erwerben ist und selber hergestellt werden muss. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten. Erstens die Produktion von Trithionat ausgehend von Tetrathionat (Oltmann & Stouthamer, 1975; Förster & Centner, 1926). Hierbei wird Tetrathionat mit Sulfit zu Trithionat und Thiosulfat umgesetzt. Problem dabei ist eine unvollständige Umsetzung des Tetrathionats. So verbleiben Tetrathionat-Reste (siehe Abb.27), die logischerweise bei der Kultivierung zu einem Wachstum der Kulturen führen. Zweitens gibt es die Umsetzung von Thiosulfat mit Wasserstoffperoxid zu Trithionat und Wasser (Nor & Tabatabai, 1975). Hierbei wäre das Problem von übrig gebliebenen, zu verwertenden Schwefelverbindungen nicht vorhanden, da *Acidianus* nachweislich nicht mit Thiosulfat wächst. Aber auch hier zeigten sich bei der Untersuchung des Endproduktes über Cyanolyse Tetrathionat-Reste und nur geringe Trithionat-Konzentrationen (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Aufreinigung und Konzentrierung des erhaltenen Trithionates über HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wäre somit unabdingbar.

Weiterhin wurde im Kulturüberstand ein Anstieg der Sulfatkonzentration und des Schwefelgehaltes gemessen. Der Anstieg der Schwefelkonzentration konnte auch qualitativ beobachtet werden (siehe Abb.26). In den Mediumskontrollen wurde hingegen kein Schwefel produziert.

Auf den DC-Platten war wie schon erwähnt beim Kulturüberstand die Abnahme des Tetrathionates sichtbar. Beim 48 h Wert waren im Kulturüberstand keine Schwefelverbindungen mehr mit PdCl_2 detektierbar. Beim 72 h Wert ließen sich jedoch wieder mehrere Banden mit PdCl_2 anfärben (siehe Abb.27). Sie kamen in den Mediumskontrollen nicht vor. Bei den Banden könnte es sich um höhere Polythionate handeln, die entweder von extrazellulären Ablagerungen oder aus geplatzten Zellen stammen.

Wuchs *Acidianus* über mehrere Wochen nur mit Tetrathionat, ließen sich die Zellen nur noch schwer mit Schwefel anziehen. Es scheint somit zu einer Adaptation der Zellen an Tetrathionat zu kommen, was mit einer Inhibition der Transkription proteincodierender Gene der Schwefelmobilisierung oder Inhibition der Translation dieser Proteine verbunden ist (siehe V.2). Somit handelt es sich bei Tetrathionat eindeutig nicht um eine Zwischenverbindung der Schwefel-Mobilisierung. Vielmehr scheint es sich beim Tetrathionat-Abbau um einen eigenständigen Stoffwechselweg zu handeln.

Zur weiteren Analyse des neu entdeckten Tetrathionat-Stoffwechsels wurden Kulturen mit verschiedenen hohen Tetrathionat-Konzentrationen angezogen. Dabei zeigte sich, dass Tetrathionat in höheren Konzentrationen (bei Tetrathionat-adaptierten Zellen ab 20 mM, bei

Schwefel-adaptierten Zellen ab 30 mM) sich negativ auf das Zellwachstum auswirkte. Ab einer Konzentration von 50 mM (bei Tetrathionat-adaptierten Zellen) bzw. 24 mM (bei Schwefel-adaptierten Zellen) wirkte sich Tetrathionat sogar toxisch aus und es fand eine extrazelluläre, visuell sichtbare Schwefelproduktion statt (siehe Abb.29). Während bei Anzucht von Kulturen mit Tetrathionat im Fermenter grundsätzlich eine Schwefelproduktion (auch bei niedrigen Tetrathionatkonzentrationen) stattfand, zeigte sich eine qualitativ sichtbare Schwefelmenge in 50 ml Kulturen meist ab einer toxischen Tetrathionat-Konzentration und nur selten bei niedrigeren Konzentrationen. Warum dies Fall war, ist bis jetzt nicht geklärt. Dass es sich bei der Schwefelproduktion um eine Spontanreaktion handelt, ist jedoch unwahrscheinlich. Zwar wurden durch Cyanolyse zeitweise hohe Werte von Thiosulfat gemessen und das instabile Thiosulfat zerfällt spontan in Schwefel und Sulfid. Die hohen Thiosulfat-Konzentrationen wurden jedoch auch in den Mediumskontrollen mittels Cyanolyse gemessen und eine Schwefelproduktion fand in hier nicht statt. Ferner konnten die Thiosulfatwerte nicht über DC bestätigt werden. Des Weiteren könnte es sich um intrazellulären gelagerten Schwefel, ähnlich der Schwefelkügelchen, handeln, der durch geplatzte Zellen in den Kulturüberstand gelangt. *Acidianus* befindet sich nach 72 h aufgrund des geringen pH-Wertes (pH = 1,0; siehe Abb.24) bereits in der Absterbephase. Dies würde bedeuten, dass die Schwefelmenge proportional zur Menge der geplatzten Zellen steigen müsste. Ob jedoch solche Mengen Schwefel in den wenigen Zellen vorhanden sein kann, ist fraglich.

Ferner wurden Kulturen zusätzlich mit β -Alanin als pH-Stabilisator angezogen. Sie zeigten sowohl in den Konzentrationen von Schwefel und ASV als auch im Wachstum dieselben Werte wie die Vergleichskulturen ohne β -Alanin.

Durch Zugabe von Tetrathionat und Schwefel sollte getestet werden, welche der beiden Verbindungen bevorzugt abgebaut wird und ob ein Umschalten zwischen den beiden Stoffwechselwegen möglich ist.

Bekamen die Zellen Schwefel und Tetrathionat gleichzeitig als Substrat (ST-Kulturen) war die Zelldichte nach 24 h rund 4 x höher, als die der S⁰- oder TT-Kulturen. Die Gehaltsbestimmungen zeigten den Verbrauch von Tetrathionat und die eindeutigen Anzeichen des Tetrathionat-Stoffwechsels (siehe Abb.31). Weiterhin war in den GHB die erwartete Sulfatakkumulation zu erkennen. Wie schon bei den Kulturen, die nur mit Tetrathionat kultiviert wurden (TT-Kulturen), zeigte sich auch hier ein hoher Thiosulfatwert nach 48 h. In den Mediumskontrollen kam zwar Thiosulfat in größeren Mengen vor, jedoch über die Zeit verteilt. Auch hier war bei Überprüfung mittels DC wieder nur Trithionat statt Thiosulfat detektierbar, so dass es sich wahrscheinlicher um Trithionat handelt. Dieser einzelne Wert (ob es sich dabei jetzt um Thiosulfat oder Trithionat handelt ist in dem Fall unerheblich)

scheint dennoch spezifisch für den Tetrathionat-Stoffwechsel zu sein. Ob auch Schwefel verbraucht wurde, konnte man weder durch Gehaltsbestimmung noch durch Dünnschichtchromatographie sehen. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Kulturen auch Schwefel verbraucht haben, da die Zellzahl gegenüber den Tetrathionat-Kulturen höher war. Bei den Proben 0 und 24 h war auf der DC-Platte Tetrathionat nachweisbar, wie auch in der Gehaltsbestimmung. Zum Zeitpunkt 48 h waren keinerlei Schwefelverbindungen durch DC detektierbar. Dies entspricht den Ergebnissen bei Wachstum der Kulturen mit Tetrathionat. Nach 72 h wurden jedoch in den ST-Kulturüberständen, anders als in den TT-Kulturüberständen keine Schwefelverbindungen mehr nachgewiesen. Der Aufbau von Polythionaten war hier nicht zu sehen. Dies bedeutet, dass die Kulturen, durch das Wachstum mit Schwefel die Polythionate verwerten, was sie bei Wachstum mit Tetrathionat nicht tun. Dies würde bedeuten, dass Polythionate als Zwischenverbindungen des Schwefelstoffwechsels in Frage kämen.

Wurden die Zellen zu Beginn nur mit Tetrathionat kultiviert und bekamen nach 48 h zusätzlich Schwefel (TA-Kulturen), so zeigten sie über die ganze Zeit den typischen Tetrathionat-Stoffwechsel. Wie auch schon in den ST- und TT-Kulturüberständen war auch hier in den ersten 24 h Tetrathionat sowohl durch Cyanolyse, als auch durch DC nachweisbar (siehe Abb.34 & 35). Beim 48 h-Wert waren auch hier keinerlei Schwefelverbindungen zu detektieren. Beim 72 h-Wert ließen sich jedoch auf der DC-Platte mehrere Schwefelverbindungen knapp über der Tetrathionat-Bande anfärben. Sie entsprachen in Größe und Zusammensetzung den Banden des TT-Kulturüberstandes zu dieser Zeit. Es könnte sich bei ihnen wieder um Polythionate handeln. Sie traten bei den ST-Kulturen hingegen, wie schon beschrieben, nicht auf.

Infolgedessen müssten *Acidianus*-Kulturen bevorzugt Tetrathionat abbauen. Dies hieße, dass erst nach Verbrauch des Tetrathionates die DNA transkribiert und das Enzym für die Schwefelmobilisierung translatiert werden muss.

Durch gleichzeitige Zugabe von Tetrathionat und Schwefel (ST-Kulturen) würde dies ab einer kritischen Minimalkonzentration des Tetrathionates geschehen, so dass der Organismus seinen Stoffwechsel passend umstellen könnte. Es würde somit ein teils biphasisches Wachstum stattfinden, bei dem zuerst Tetrathionat und dann Schwefel abgebaut wird. Jedoch würde es einen fließenden Übergang vom Tetrathionat- zum Schwefelstoffwechsel geben, so dass ein biphasisches Wachstum nicht sichtbar ist. Die späte Transkription der DNA für die Schwefelmobilisierung war auch mittels Northern-Analyse nachweisbar (siehe V.6).

Bei späterer Zugabe von Schwefel kann die Transkription erst nach 48 h angekurbelt werden. Hier ist eine kritische Mindestkonzentration von Tetrathionat aber schon erreicht. Die Zellen erhalten somit eine neue Schwefelquelle erst, nachdem die alte vollständig

verbraucht ist. Somit ist hier ein biphasisches Wachstum sichtbar (siehe Abb.16). Polythionate werden hierbei noch nicht verbraucht, da der Schwefelstoffwechsel erst angekurbelt werden muss. Dies hieße weiterhin, dass Polythionate nur verbraucht werden können, wenn wichtige Enzyme des Schwefelstoffwechsels vorhanden sind, die bei Wachstum mit Tetrathionat nicht benötigt werden.

Wie oben schon ausgeführt, ist Thiosulfat unter den gegebenen Anzuchtbedingungen nicht stabil und zerfällt sofort in Schwefel und Sulfit. Somit war eine Anzucht von *Acidianus* mit Thiosulfat (TS-Kulturen) auch wenig erfolgreich. Noch vor Animpfen des Mediums mit den Zellen hatte sich bereits nach Inkubation bei 80° C eine große Menge an visuell sichtbarem Schwefel gebildet (siehe Abb.37). Die Kulturen wuchsen in dem Medium nicht an. Da sie zumindest in der Lage sein sollten den Schwefel zu verwerten, scheint die gebildete Schwefelmenge nicht auszureichen oder das gebildete Sulfit ist für *Acidianus* toxisch. Auffallend war, dass in den Kulturüberständen die Thiosulfatkonzentration in größerem Maße abnahm (85,2,%) als in der Mediumskontrolle (33,8%; Abb.36). Dies würde bedeuten, dass *Acidianus* zwar in der Lage ist Thiosulfat zu verwerten, ein Wachstum hier aber nicht möglich war, da das restliche Thiosulfat spontan zerfiel, noch bevor die Kulturen es verwerten konnten. Eine Anzucht mit höheren Thiosulfat-Konzentrationen könnte dieses Problem beheben.

2 Das Schwefel-Binde-Protein

Eine proteinkatalysierte Schwefelmobilisierung zur Aufnahme des Substrates in die Zelle ist bis jetzt nur bei *Chromatium vinosum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* beschrieben. *Chromatium vinosum* speichert Schwefel in Vesikeln außerhalb der Zellen. Gefunden wurden dabei drei Proteine, die diese Schwefelkügelchen umhüllen (Prange *et al.*, 2002a). *Acidithiobacillus ferrooxidans* ist bisher der einzige Organismus bei dem ein Schwefelbindeprotein beschrieben wurde (Ohmura *et al.*, 1996). Dieses Protein ist in der Flagelle lokalisiert. Die Proteinsequenz (für Sequenzvergleiche) ist jedoch leider nicht vorhanden. *Sulfolobus acidocaldarius* hingegen besitzt Pili zur Anlagerung an den Schwefel. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen heftet sich *Acidianus* nicht an den Schwefel (Kletzin, persönliche Mitteilung; Zillig *et al.*, 1986). Dies bedeutet, dass die Zellen ein extrazelluläres Transport- oder Bindsystem besitzen müssen, was sie in die Lage versetzt auch ohne Kontakt zum Schwefel wachsen zu können. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen in säure- und hitzebeständigen Dialyseschläuchen getrennt vom Schwefel angezogen. Dabei zeigte sich, dass die Zellzahl *Acidianus* um das 1,78-fache zunahm

(siehe Abb.38). Zellen konnten im Kulturüberstand außerhalb des Dialyseschlauches nicht detektiert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass *Acidianus ambivalens* in der Lage ist ohne Kontakt zum Schwefel aeroben Schwefelmetabolismus zu betreiben. Dies bedeutet, dass *Acidianus* ein extrazelluläres Schwefel-Binde-System (oder Schwefelumsetzendes System) besitzen muss, welches den elementaren Schwefel mobilisiert und ihn für die Aufnahme in die Zelle zugänglich macht.

Um extrazelluläre Proteine von *Acidianus* zu isolieren, wurden Kulturüberstand und Schwefel nach Kulturwachstum untersucht. Bei der Untersuchung des Kulturüberstandes konnten Proteine isoliert werden, die jedoch alle verschiedene Größen aufwiesen und meistens mit Proteinhintergrund geplatzter Zellen einhergingen (siehe Abb.39). In einem Fall konnte ein einzelnes Protein mit einer molekularen Masse von 18 kDa isoliert werden, welches kein Hintergrund auf dem Gel nach Silberfärbung zeigte. Diese Isolierung war jedoch aus dem Kulturüberstand nicht reproduzierbar.

Der Versuch einer Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand über Säulen brachte auch keinen Erfolg. Mit dem proteinbindenden Säulenmaterial PAD-1 wurde ein 66 kDa Protein sowohl beim Kulturüberstand nach Wachstum der Kultur aerob als auch anaerob mit Schwefel angereichert (siehe Abb.40). Hierbei handelt es sich somit nicht um ein Protein des aeroben Schwefelmetabolismus.

Mit Schwefelsäulen kam es zu einer bräunliche Färbung im Eluat, die in keiner anderen Fraktion der Säulenaufreinigung vorkam. Es konnten durch SDS-PAGE selbst mit Silberfärbung keine Proteine detektiert werden (siehe Abb.42). Auch die Untersuchung des Eluats durch DC zeigte keine spezifischen niedermolekularen Verbindungen.

Dies lässt den Schluss zu, dass sich entweder keine Proteine im Kulturüberstand befinden, die am extrazellulären Teil des Schwefelstoffwechsels beteiligt sind oder aber deren Konzentration so gering ist, dass ein Nachweis ohne eine funktionierende Säulenaufreinigung unmöglich wäre.

Bei Untersuchung des Schwefels konnte ein Protein isoliert werden, welches eine Masse zwischen 18 und 35 kDa aufwies (siehe Abb. 44). Dabei zeigte sich, dass bei mehrmaliger Auftrennung der Proteinlösung über SDS-PAGE sich die Masse des Proteins von SDS-PAGE zu SDS-PAGE änderte. Sie lag dabei zwischen 18 und 35 kDa. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich somit bei allen isolierten Proteinen in diesem Massenbereich um das gleiche Protein handelt. Dieses Protein, aufgrund seiner vermuteten Funktion Schwefel-Binde-Protein (SBP) genannt, konnte spezifisch nur aus dem Schwefel aerob gewachsener Zellen isoliert werden. Bei Wachstum der Zellen aerob mit Tetrathionat oder anaerob mit Schwefel war dieses Protein nicht zu detektieren.

Beim SBP scheint es sich um ein spezifisches extrazelluläres Protein des aeroben Schwefel-Stoffwechsels zu handeln. Weiterhin scheint es sich bei dem aus dem Kulturüberstand isolierten 18 kDa Protein ebenfalls um das SBP zu handeln, welches dort wahrscheinlich in sehr viel geringeren Mengen vorlag.

Eine Überprüfung des Schwefels (direkt aus der Packung, ohne Inkubation mit *Acidianus*-Medium) zeigte, dass keine Proteinverunreinigungen dem Schwefel anhafteten. Im Schwefelsediment nach anaeroben Wachstum der Kultur mit Schwefel waren ebenfalls keine Proteine vorhanden. Da die anaerobe Schwefelatmung membrangebunden durch die Schwefelreduktase abläuft, ist hier ein extrazelluläres Schwefel-Binde-Protein auch nicht von Nöten.

Beim aeroben Tetrathionat-Stoffwechsel ist ebenfalls kein sekretiertes Protein nötig. Einerseits handelt es sich beim Tetrathionat-Metabolismus um einen eigenständigen Stoffwechselweg (siehe 1). Des Weiteren ist hier eine Schwefelmobilisierung nicht notwendig, da der gebildete Schwefel nicht Ausgangsprodukt sondern Neben- oder Endprodukt ist. Das Fehlen des SBP im Kulturüberstand bei aeroben Tetrathionat-Stoffwechsel erklärt, wieso Tetrathionat-adaptierte Zellen, sich nur noch schwer mit Schwefel kultivieren ließen. Durch fehlende SBP, konnte die Anfangsreaktion des Schwefel-metabolismus, sprich die Schwefelmobilisierung, nicht durchgeführt werden und die Zelle mußte erst die Translation des SBP starten. An der Transkription hingegen kann es nicht liegen, da durch Northern-Analyse gezeigt wurde, dass die *sbp*-RNA auch bei Kulturen, die mit Tetrathionat angezogen wurden, vorhanden war (siehe Abb.74). Das initiale Enzym des Schwefelstoffwechsels, die SOR war in Tetrathionat-adaptierten Zellen hingegen aktiv (Urich, persönliche Mitteilung), so dass nur das Fehlen des SBP zu den Anzuchtsschwierigkeiten, führen konnte.

Sulfurisphaera kann wie *Acidianus* oder *Sulfolobus* mit elementarem Schwefel wachsen. Während bei *Sulfolobus* bekannt ist, dass er an den Schwefel bindet (Weiss *et al.*, 1976), sind die primären Prozesse bei *Sulfurisphaera*, wie auch bei *Acidianus* noch nicht untersucht worden. Das Schwefelsediment von *Sulfurisphaera* MC1 wurde ebenfalls mit harnstoffhaltigem Puffer behandelt und der Schwefelüberstand mittels SDS-PAGE untersucht. Auch hier war jedoch kein Protein detektierbar.

Um das Schwefel-Bindeprotein nativ aus dem Schwefelsediment nach Kulturwachstum zu isolieren, wurde der verwendete Harnstoff im Puffer durch Detergenzien ersetzt. Eine Isolierung war sowohl mit DOC, DM, TWEEN-20, OG, als auch mit Triton X-100 möglich. Die Menge des isolierten Proteins war bei Verwendung von Detergenzien höher als bei Verwendung von Harnstoff. Auch hier zeigte sich eine Änderung der molekularen Masse. Die Masse des Proteins lag hierbei jedoch zwischen 45 und 50 kDa. Auch bei dieser Isolierung könnte es sich um das SBP handeln, da die Auftrennung eines Überstandes mit

Harnstoff und eines mit Triton X-100 isoliertem Proteins über SDS-PAGE zeigte, dass in beiden Überständen nur eine Bande bei 45 kDa zu sehen war (siehe Abb.47B). Auch die Silberfärbung der PA-Gele zeigte immer nur ein Protein, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei allen isolierten Proteinen aus dem Schwefelsediment wirklich das gleiche Protein handelt.

Die Bestimmung der SBP-Sequenz durch MALDI-TOF-Analysen oder N-terminale Sequenzierung brachten kein Ergebnis. Bei den MALDI-TOF-Analysen ließen sich die erhaltenen Fragmente weder einer Sequenz aus dem *Acidianus*-Genom zuordnen, noch waren sie untereinander vergleichbar (Abb.54). Bei der N-terminalen Sequenzierung der Proteinlösung zeigte sich eine N-terminale Blockierung. Da die Entfaltung des Proteins zur Eliminierung der Bindung an den Schwefel bei pH-Werten größer 8 durchgeführt wurde, kann es zu einer künstlichen Blockierung der Proteine kommen (Lottspeich & Zorbas, 1998a). Um diese Blockierung zu umgehen, wurde versucht den pH-Wert des Entfaltungspuffers (EF.A-Puffer) von 8,5 auf 6,0 zu senken. Dabei zeigte sich, dass kein Protein mehr isoliert werden konnte (siehe Abb.50). Das SBP zeigte somit eine pH-Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten. Beim SBP handelt es sich um ein sekretiertes Protein. Der Kulturüberstand weist während des Wachstums von *Acidianus* einen pH-Wert zwischen 2,5 und 1,0 auf. Ein pH-Stabilität bei niedrigen pH-Werten ist somit nichts ungewöhnliches.

Zur N-terminalen Sequenzierung wurde schließlich das Schwefelsediment nach Kulturwachstum (ohne Behandlung mit Puffern) verwendet. Da hier die Sequenzierung gelang, war somit der N-Terminus des SBP nicht blockiert und die oben beschriebene Blockierung war durch die Behandlung mit dem Puffer künstlich eingeführt. Durch die Sequenzierung des SBP direkt aus dem Schwefel ergab sich eine Mischsequenz, die nur mit dem contig 275 übereinstimmte. Dieser contig enthält die Sequenz für ein hypothetisches Protein. Das SBP beginnt mit einem Serin und ist bis zum ersten Stopcodon im contig 310 Aminosäuren lang, was einer Masse von 34,1 kDa entspricht (Abb.51B). Dies entspricht der Auftrennung des SBP über SDS-PAGE, bei der das Protein häufig eine Masse um die 35 kDa aufwies. Die Strukturvorhersage mit dem Program Psi-Pred ergab mehrere β -Faltblatt- und coil-Strukturen sowie wenige α -Helices.

Der pI des SBP liegt bei 6,04. Dies erklärt, warum die Entfaltung des Proteins bei pH 6,0 nicht gelang (siehe oben). Stimmen pH- und pI-Wert überein, so kommt es zu einer isoelektrischen Präzipitation, bei der das Protein durch Minimierung der Löslichkeit ausfällt (Voet & Voet, 1994; Arakawa & Timasheff, 1985). Das SBP sedimentierte somit und der untersuchte Überstand enthielt kein Protein mehr.

Ein hypothetischer Trypsin-Verdau des SBP wurde mit den erhaltenen Fragmenten der MALDI-TOF-Analysen verglichen (siehe Abb.54). Dabei zeigte sich, dass die erhaltenen

MALDI-TOF Fragmente nicht beim hypothetischen Trypsin-Verdau des SBP vorkamen. Ein Vergleich der Fragmente über das Programm FindPept (Expasy) zeigte, dass die erhaltenen Massen der MALDI-TOF-Analysen im SBP nur zu finden waren, wenn man (hypothetisch) ein unspezifischen Verdau vornahm (für MALDI-TOF-Analysen 7 und 8 siehe VIII.2). Ein Trypsinverdau von SBP zeigte, dass viele kleine Fragmente entstanden, die durch SDS-PAGE nicht mehr detektiert werden konnten (eigene Beobachtungen und Mentele [AG Lottspeich], persönliche Mitteilung).

Extrazelluläre Proteine besitzen häufig eine Signalsequenz zum Transport aus der Zelle. Vor dem durch Sequenzierung bestimmten Start des SBP befinden sich vier Methionine (siehe Abb.51B). Vor den ersten drei Methioninen liegt in passenden Abstand jeweils ein TATA-Box-Motiv, beim vierten hingegen nicht. Die Signalsequenz ausgehend vom zweiten Methionin (PLM) enthält weiterhin ein Sequenzmotiv aus zwei Lysinen und einem darauf folgenden hydrophoben Aminosäureteil. Diese Signalsequenz wurde mit den Signalsequenzen von *Sulfolobus solfataricus* (SSO) verglichen (siehe VIII.5; ; Albers & Driessen, 2002).

Signalsequenzen lassen sich in vier Klassen unterteilen (Abb.77). In *Sulfolobus solfataricus* wurden alle vier Signalpeptidklassen gefunden (siehe VIII.5). Beim sekretorischen Signalpeptid (Abb.77A) ist die N-Domäne im Durchschnitt mit zwei Aminosäureresten (Arginin oder Lysin) positiv geladen. Die H-Domäne enthält einen höheren Anteil an Leucin und Isoleucin. Ein Twin-Arginine-Signalpeptid enthält die Erkennungssequenz KRRKFLK (Abb.77B; Berks *et al.*, 2000), ein Lipoprotein-Signalpeptid hat hingegen die Consensus-Sequenz [I/L/G/A]-[A/G/S]-C (Abb.77C). Beim Typ IV Pilin-Signalpeptid liegt die C-Domäne vor der H-Domäne. Die Signalpeptidase schneidet vor der C-Domäne, so dass sowohl die C- als auch die H-Domäne im Protein und nicht in der abgespaltenen Signalsequenz liegen (Abb.77D). Alle Signalpeptide dieser Klassen lassen sich in die drei Domänen N, C und H unterteilen (Pugsley, 1993; von Heijne, 1990). Die N-Domäne enthält basische Aminosäurereste und interagiert mit dem Lipidbilayer während der Translokation (de Vrije *et al.*, 1990). Die H-Domäne enthält etwa 10 – 15 hydrophobe Aminosäurereste, die die Tendenz haben eine α -Helix zu formen (Albers & Driessen, 2002). Die dritte Domäne (C-Domäne) ist sehr kurz und enthält die Erkennungsstelle für die Signalpeptidase, die die Signalsequenz vom Protein abspaltet. In der PLM-Signalsequenz war sowohl eine H-Domäne mit hydrophoben Aminosäuren und einem vorhergesagten α -helicalen Bereich als auch eine davorliegende N-Domäne mit zwei positiv geladenen Lysinen zu sehen. Eine C-Domäne war nicht wirklich vorhanden, da die hydrophoben Aminosäuren bis an den durch Sequenzierung bestimmten Proteinstart reichten. Da die α -Helix jedoch nur bis zur vorletzten Signalpeptid-Aminosäure vorhergesagt wurde, könnte es sich bei der letzten Amino-

säure des Signalpeptids um die C-Domäne handeln (siehe Abb.53). Bei der PLM-Signalsequenz handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein sekretorisches Signalpeptid.

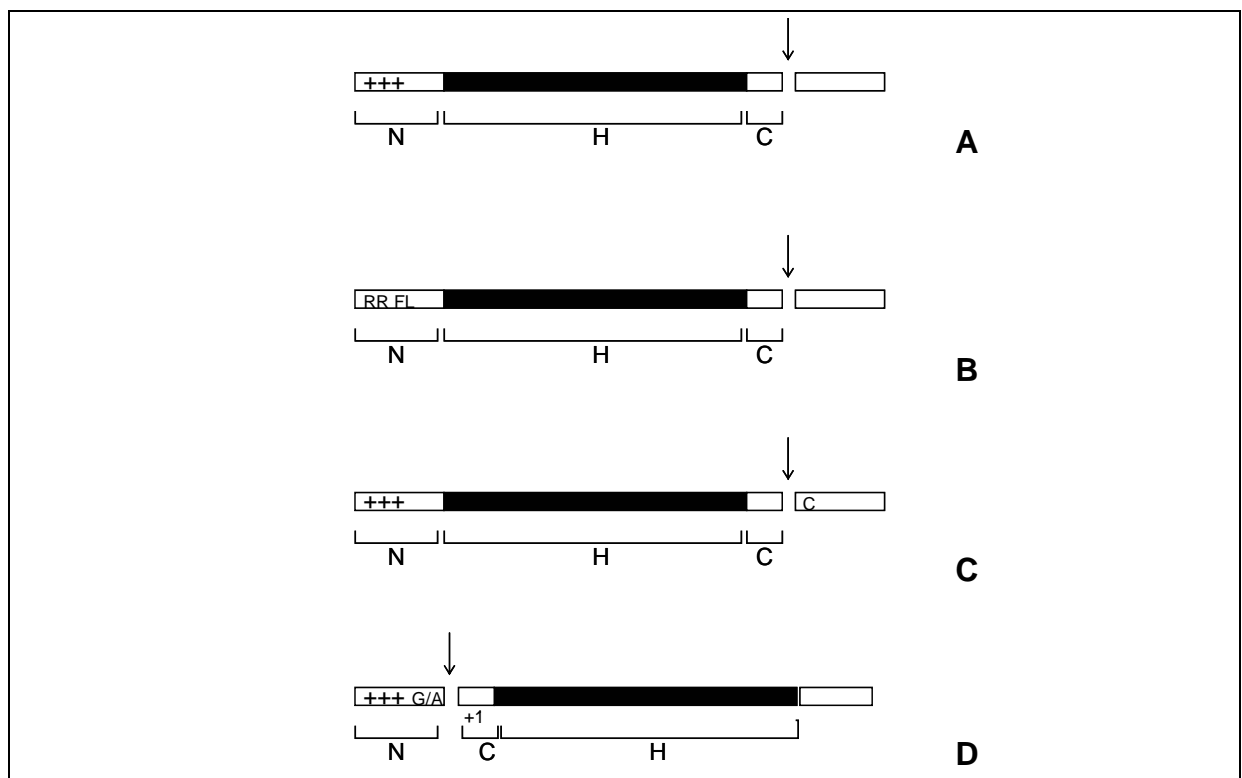


Abbildung 77: Die verschiedenen Klassen von Signalpeptiden (Albers & Driessen, 2002).

A = Sekretorisches Signal-Peptid, B = Twin-arginine Signal-Peptid, C = Lipoprotein Signal-Peptid, D = Typ IV Pilin Signal Peptid; N, H und C sind die drei Domänen des Signalpeptids, die Pfeile zeigen die Spaltstelle der Signalsequenz an; + = positive Ladung, schwarz = hydrophobe Reste; bei RR FL und G/A handelt es sich um spezifische Sequenzmotive dieses Signalpeptids.

Bei Abspaltung der Signalsequenz werden sekretierte Proteine zumeist glykosyliert (Moens *et al.*, 1997). Die Glykosylierung dient dabei vor allem dem Schutz vor Hitze (Olsen & Thomsen, 1991) und Proteasen (Langsford *et al.*, 1987; Rehm, 2002c).

Die Glykosylierung des SBP wurde durch Alcian Blau-Färbung nachgewiesen (Wardi & Michos, 1972). Dabei zeigte sich eine starke Färbung des Proteins mit Alcian-Blau. Dies entspricht wahrscheinlich auch einer starken Glykosylierung. Es ist allerdings nicht angegeben (Wardi & Michos, 1972), ob die Färbeintensität proportional zum Zuckergehalt der Proteine ist, oder ob die Färbeintensität vom Aufbau der Zuckerkette abhängt.

Als Überprüfung könnte man eine Lektinfärbung probieren, die zudem sehr sensitiv ist. Da bestimmte Lektine nur an bestimmte Zucker binden, könnte man, insofern das SBP nicht mehrere Zuckerketten besitzt, durch Lektinfärbung einen Einblick auf den Aufbau einzelner Oligosaccharide erhalten (Hortin & Timpe, 1990; Kijimoto, *et al.*, 1985, Rohringer & Holden, 1985).

Die Suche nach Glykosylierungsstellen in der SBP-Sequenz erfolgte mit dem Programm GlycoMod (ExPASy). Die *consensus*-Sequenz für eine N-glykosidisch gebundenen Zucker

lautet dabei NxS/T (wobei x = beliebige Aminosäure, außer Prolin) (Konrad *et al.*, 2002; Lottspeich & Zorbas, 1998; Rehm, 2002; Wacker *et al.*, 2002). Es ergaben sich 13 mögliche Consensus-Sequenzen, von denen eine bei Berechnung mit GlycoMod (Expasy) als mögliche N-Glykosylierungsstelle angegeben wurde (siehe VIII.3). Bei einer O-Glykosylierung bindet der Zucker an ein Serin oder Threonin. In diesem Fall wurde mit Glyko-Mod zwei mögliche Stellen in der SBP-Sequenz gefunden. Da die eine O-Glykosylierungsstelle identisch mit der N-Glykosylierungsstelle ist, würde das bedeuten, das höchstens zwei Glykosylierungsstellen sich im Protein befinden. Ob man hier mittels einer Lektinfärbung noch den Aufbau der Zuckerketten bestimmen kann ist allerdings fraglich.

Um festzustellen, welche glykosidische Bindungen vorliegen, wurde eine enzymatische Deglykosylierung versucht. Dazu wurden die Enzyme PNGaseF (auch N-Glycosidase F, Peptid-N-glycosidase F oder Peptid-N⁴-[Acetyl- β -Glucosaminyl]-Asparagin-Amidase genannt), O-Glycosidase (auch O-Glycan-Peptid-Hydrolase oder O-Glykopeptid-Endo-D-Galactosyl-N-acetyl- α -Galactosamino-Hydrolase genannt) und Neuraminidase verwendet. Die PNGaseF spaltet N-Glykanketten, wenn diese Asparagin gebunden sind, zwischen dem Asparagin des Proteins und dem endständigen GlcNAc der Zuckerkette. Dabei wird das Asparagin in Aspartat umgewandelt, wodurch sich die Ladung und das Verhalten des Proteins verändert. Die Empfindlichkeit einer Deglykosylierung mit Endoglykosidasen ist jedoch abhängig vom Aufbau der Zuckerketten (Maley *et al.*, 1989).

Die O-Glycosidase spaltet Gal- β -(1–3)-GalNAc von O-Glykanen, wenn diese an Serin oder Threonin gebunden sind (Umemoto *et al.*, 1977). Die Neuraminidase hydrolysiert die Glykolipide und spaltet Sialinsäure ab (Beutler, 1984).

Bei unvollständigem Verdau mit den Deglykosylierungsenzymen sollte in der SDS-PAGE eine Leiter verschiedener Glykoformen zu sehen sein (Alexander & Elder, 1989; Elder & Alexander, 1992; Maley *et al.*, 1989, Rehm *et al.*, 1989; Thotokura & Bahl, 1987). Das vollständig deglykosylierte SBP sollte bei Alcian-Blau-Färbung keine Bande mehr anzeigen. Auf dem PA-Gel waren zwei SBP-Banden sichtbar, was auf einen unvollständigen Verdau bei allen Enzymvarianten schließen lässt. Da jedoch häufig bei einer enzymatischen Deglykosylierung ein vorheriger Trypsinverdau empfohlen wird (Lottspeich & Zorbas, 1998), waren wahrscheinlich trotz Entfaltung des Proteins mit 8 M Harnstoff nicht alle Stellen zur Deglykosylierung für die Enzyme frei zugänglich. Ein Trypsinverdau des SBP war jedoch nicht möglich, da das Protein bei der Trypsinspaltung unspezifisch zerlegt wird (siehe oben). Das Alcian-Blau-gefärbte Gel zeigte keine Unterschiede zur Coomassie-Färbung. Dies bedeutet, dass die Färbeintensität nicht mit dem Zuckergehalt des Proteins korreliert ist. Eine vollständige Deglykosylierung des Proteins war somit auf enzymatischem Weg nicht möglich.

Eine chemische Deglykosylierung zur Bestimmung der Zuckerbindung (N- oder O-glykosidisch) konnte nicht durchgeführt werden. Die verschiedenen Methoden zur chemischen Deglykosylierung spalten unspezifisch Zucker ab und zerlegen zumeist das Peptid gleich mit (Gerken *et al.*, 1992; Rademaker *et al.*, 1998; Rehm *et al.*, 1986). Einzige Möglichkeit wäre eine β -Oxidation (Hanisch *et al.*, 2001), bei der die zuckertragenden Aminosäuren so stark verändert werden, so dass man am Massenspektrometer den Ort der Glykosylierung bestimmen kann. Dazu müsste allerdings eindeutige MALDI-TOF-Analyse zum Vergleich vorhanden sein. Da jedoch sowohl mit Trypsin als auch mit Bromcyan unspezifische Fragmente des SBP entstehen, müsste zuerst eine „funktionierende“ Spaltung des Proteins gefunden werden.

Besonders auffällig war die extreme bräunliche Färbung des Proteins. Diese Färbung kam nicht in den Kulturüberständen und Schwefelfiltraten bei anaeroben Kulturwachstum mit Schwefel und aeroben Wachstum mit Tetrathionat vor (siehe Abb.45). Eine Untersuchung, ob es sich bei der Färbung um Eisen und somit um Eisen-Schwefel-Zentren handeln könnte, wurde durch Eisen- und Sulfid-Gehaltsbestimmungen untersucht.

Die Eisengehaltsbestimmung ergab einen stark erhöhten Eisenwert in den SBP-Lösungen im Vergleich zu Filtraten ohne Protein (Anaerob bzw. Tetrathionat). Im Medium war ein leicht erhöhter Eisengehalt zu verzeichnen, der auf das im Medium vorhandene FeSO_4 zurückzuführen war. Im Schwefel sowie im Puffer war wie erwartet kein Eisen feststellbar. Somit war in den SBP-Lösungen eindeutig eine Anhäufung von Eisen zu verzeichnen, die mit dem in der Lösung vorhandenen SBP einhergeht. Der Eisengehalt stieg auch bei Erhöhung der Proteinkonzentration an. Eine Umrechnung des Eisengehaltes pro μl Lösung in Eisen pro μg Protein war jedoch nicht möglich, da aufgrund der extremen Färbung des Proteins eine Proteingehaltsbestimmung unmöglich war und ein ungefährender Proteingehalt nur über die Bandenstärke bei der SDS-PAGE geschätzt werden konnte.

Um auf das Vorhandensein von FeS -Clustern zu schließen, mussten jedoch auch die Sulfid-Werte zu den Eisengehaltsbestimmungen passen. Hierbei zeigte sich jedoch ein gänzlich anderes Bild. Während im Medium, wie erwartet kein Sulfid nachweisbar war, waren im Puffer geringe Sulfid-Werte feststellbar, welche höchstwahrscheinlich aufgrund des β -Mercaptoethanols zustande kamen. Die Inkubation von elementarem Schwefel mit dem Puffer zeigte erhebliche Sulfidmengen im Überstand, welche auf eine Spontanreaktion des Schwefels mit dem Puffer (insbesondere dem β -Mercaptoethanol) zurückzuführen waren. Bei den SBP-Lösungen war der Sulfid-Gehalt niedriger als der des inkubierten Schwefels. Die oben erwähnte Spontanreaktion des elementaren Schwefels scheint bei dem Schwefel der SBP-Lösungen nicht stattzufinden.

Acidianus mobilisiert den Schwefel, so dass der Schwefel nach Kulturwachstum möglicherweise so verändert ist, dass er nicht mehr mit β -Mercaptoethanol eine Spontanreaktion eingehen kann. Da *Acidianus* aber mit einem Überangebot an Schwefel wächst (nur 7% des angebotenen Schwefels werden verbraucht), ist folglich noch elementarer Schwefel nach Kulturwachstum vorhanden, welcher nicht vom SBP aktiviert wurde. Dieser Schwefel könnte für den Sulfidgehalt in den SBP-Lösungen verantwortlich sein, so dass man nicht von einem Fe-S-Zentrum ausgehen sollte. Der Sulfid-Gehalt des SBP war rund 3-mal niedriger als der des Eisens.

Die Consensus-Sequenz für ein bakterielles [4Fe4S]-Cluster lautet CxxCxxCxxxCP. Alternativ kann anstelle eines Cysteins auch Histidin oder Asparagin fungieren. In der Sequenz von *Acidianus* ist je ein Prolin hinter einem Histidin und einem Asparagin vorhanden. Weiterhin enthält die Sequenz fünf Cysteine. Auf dem ersten Blick ist keine Consensus-Sequenz für ein Eisen-Schwefel-Zentrum vorhanden (siehe Abb.59). Durch Faltung des Proteins können jedoch auch weit auseinanderliegende Cysteine (alternativ Histidin oder Asparagin) ein Eisen-Schwefel-Zentrum bilden, wie beispielsweise bei der Hydrogenase-Untereinheit HynS (Lauber, 2002).

Weiterhin könnte der erhöhte Eisengehalt in den SBP-Proteinlösungen auf ein Eisenzentrum zurückzuführen zu sein. Dies würde ebenso wie ein FeS-Cluster mit der Hypothese des *isc*-Cluster-Modells übereinstimmen, bei dem der Schwefel nach der Aktivierung durch das SBP in einer Kaskade von Proteinen weitertransportiert wird. Zur Überprüfung der Hypothese müssten jedoch auch noch andere besonders am Schwefeltransport beteiligte Proteine gefunden werden, um ein Modell über Mobilisierung und Transport erstellen zu können. Um die Frage zu klären, ob es sich um ein Eisen- oder Eisen-Schwefel-Cluster handelt, könnten EPR-Spektren (Elektronenspinchromatographie) durchgeführt werden.

Bei TCA- bzw. HCl-Fällung von SBP fiel auf, dass nur in der Hälfte aller Fälle Protein ausfiel. Die Chloroform-Methanol-Fällung hingegen funktionierte immer. Bei den Fällungen des SBP mit Ethanol oder Aceton zeigte sich, dass das Protein nicht gefällt werden konnte, sondern im Überstand verblieb (Abb.61). Die Überprüfung mit BSA zeigte, dass bei beide Fällungen eine Sedimentierung von BSA möglich war.

Somit scheint es sich beim SBP um ein hydrophobes Protein zu handeln, da bei beiden Fällmethoden eine Ausfällung von hydrophobem Protein meist nicht möglich ist (Scopes *et al.*, 1994). Die Sequenz des SBP enthält zu 23,6% die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Methionin, Leucin und Valin. Dies liegt 2,9% über dem Durchschnitt (Klapper, 1977; Voet & Voet, 1994). Rechnet man die Aminosäuren Alanin, Cystein, Phenylalanin und Tryptophan noch hinzu kommt man auf 36,8% hydrophobe Aminosäuren und liegt damit

0,3% unter dem durchschnittlichen hydrophoben Anteil in Proteinen (berechnet aus 207 nicht verwandten Proteinen). Ein Anteil von 36,8% hydrophoben Aminosäuren ist dennoch ziemlich hoch, da der Anteil an hydrophilen Aminosäuren im SBP nur bei 8,4% liegt und die Fällungen mit Aceton und Ethanol zeigten (s.o.), dass das SBP aufgrund seines hydrophoben Aminosäureanteils nicht mehr ausfällt. Ein höherer hydrophober Anteil von Aminosäuren im SBP ist wichtig, da das Protein an den hydrophoben Schwefel binden muss.

Um festzustellen, ob es sich beim SBP um einen S-Layer handelt, wurden S-Layer-Isolierungen einerseits aus Zellmaterial von *Acidianus ambivalens*, andererseits mit Schwefelsediment nach aerobem Wachstum der Zellen mit Schwefel bzw. Tetrathionat durchgeführt. Während aus den Zellen mehrere S-Layer verschiedener Masse isoliert wurden, konnten in den Schwefelfractionen keine S-Layer nachgewiesen werden (siehe Abb.62). S-Layer sind zumeist membrangebundene glykosylierte Proteine bestehend aus mehreren Untereinheiten, die eine Masse von über 40 – 230 kDa besitzen (Sleytr *et al.*, 1999). S-Layer sind zumeist in der Membran verankert. Bislang wurde ein extrazellulärer S-Layer nur aus *Sulfolobus* charakterisiert (Albers, persönliche Mitteilung).

Ein Vergleich von Aminosäuresequenzen typischer S-Layer-Proteine mit dem SBP zeigte, dass typische S-Layer-Proteine einen hohen Anteil an sauren und hydrophoben Aminosäuren sowie einen isoelektrischen Punkt im schwach sauren Bereich haben (Pum *et al.*, 2000). Dies stimmt nicht vollständig mit den Sequenzdaten des SBP überein. So ist pI-Wert mit 6,04 zwar im schwach sauren Bereich und der hydrophobe Aminosäureanteil liegt bei 36,8%. Der Anteil an sauren Aminosäurenresten hingegen liegt beim SBP nur bei 3,87%. Aminosäureanalysen zeigen, dass S-Layer-Proteine von Organismen verschiedener phylogenetischer Gruppen, so ziemlich die gleiche Zusammensetzung besitzen (Sleytr *et al.*, 1999). So ist Lysin die am meisten vorherrschende Aminosäure, während der Arginin-Histidin- und Methionin-Gehalt meistens sehr gering ist. Cystein wurde nur in einigen wenigen S-Layer-Proteinen detektiert (Pum *et al.*, 2000). In *Methanococcus* beispielsweise ist die Aminosäure Aspartat vorherrschend. Lysin ist in größeren Mengen vorhanden, Histidin und Cystein kommen überhaupt nicht vor (Akca *et al.*, 2002). Die Aminosäurezusammensetzung der S-Layer-Proteine ist dabei in allen Methanococci (mesophil bis extrem thermophil) signifikant konserviert.

Im SBP sind die vorherrschenden Aminosäuren Threonin (11,6%) und Serin (10,3%). Lysin und Aspartat kommen nur zu 1,6% bzw. zu 1,3% vor und liegen damit weit unter dem Durchschnitt (Voet & Voet, 1994). Die Gehalte an Methionin (0,6%), Histidin (1,3%), Arginin (1,6%) und Cystein (1,6%) sind zwar gering, aber das Gesamtbild der Aminosäurezusammensetzung stimmt in keiner Weise mit der Aminosäurezusammensetzung eines S-Layers

überein. Somit handelt es sich nach dem jetzigen Erkenntnisstand bei dem isolierten SBP nicht um einen S-Layer.

3 Expression in *E. coli*

Zur Expression in *E. coli* wurden die Expressionsvektoren pTYB4, pET28c, pMAL-c2X und pMAL-p2X sowie das Hilfsplasmid CodonPlus verwendet. Als Gensequenzen diente die *sbp*-Sequenz ohne (*pol*) bzw. mit Signalsequenz (*pII*, *pII* & *pII*). *Inclusion bodies* waren nirgends feststellbar. Die Detektion von Zielprotein in den cytoplasmatischen und membran-gebundenen Proteinfractionen der aufgeschlossenen Zellen nach Expression, wurde mittels SDS-PAGE, spezifischer Säulenaufreinigung (CBD und Amylose) sowie Western-Analysen gegen den Fusionsproteinpartner (His-Tag bzw. MBP) durchgeführt. Beim Expressionssystem mit dem pMAL-p2X-Vektor wurde auch die periplasmatische Proteinfraction untersucht, da durch diesen Vektor bei der Expression periplasmatisches SBP-Fusionsprotein produziert werden sollte.

Jedoch konnte in keinem Fall Zielprotein detektiert werden. Da sowohl in den pTYB4- als auch der pET28c-Vektor schon *Acidianus*-Gene inseriert wurden und durch Expression auch Protein hergestellt wurde (Albrecht, 2004; Lauber, 2002), kann das Fehlen des Zielproteins nicht auf eine Inkompatibilität der Vektoren mit *Acidianus*-Genen zurückgeführt werden. Die beiden verwendeten pMAL-Vektoren enthalten vor dem Zielgen das Gen (*mal E*) des Maltose-Binde-Proteins (MBP). Dies ist ein sehr stabiles Protein, durch welches eine Bildung von *inclusion bodies* vermieden werden soll (Maina *et al.*, 1988). Ist das Zielprotein jedoch instabil, entsteht durch die Expression ein Abbruchkonstrukt aus MBP. Bei Amylosesäulenaufreinigung der cytoplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* TB1 x CP x pMAL-c2X-POL war eine MBP-Bande zu erkennen. Nach Berechnungen des Programmes Prot-Param wurde jedoch das SBP als stabil klassifiziert, mit einer möglichen Halbwertszeit in *E.coli* von über 10 h. Trotzdem scheint das SBP in *E. coli* nicht stabil zu sein. Eine Expression des *sbp* in *Sulfolobus solfataricus* unter sozusagen nativen Bedingungen mit dem pJM03-Vektor (Jonuscheit *et al.*, 2003) wäre vielleicht aussichtsreicher und ist in Arbeit (Veith, 2006, in Arbeit). Eine weitere Möglichkeit wäre die Expression in Hefe, da die mögliche Halbwertszeit des SBP in Hefe mit 20 h angegeben wurde. Ebenso könnte der pRKisc-Vektor als weiteres Hilfsplasmid bei der Expression in *E. coli* helfen. Durch den pRKisc-Vektor werden spezifisch Eisen-Schwefel-Cluster in Zielproteine inseriert (siehe Abb.8).

4 Funktionstest

Da das Schwefel-Binde-Protein spezifisch im Schwefel gefunden wurden, muss eine Bindung des Proteins mit dem Schwefel existieren. Mittels Funktionstest sollte dies überprüft werden.

Dazu wurde SBP-Protein, isoliert mit Triton X-100 aus *Acidianus*, mit Schwefel inkubiert, wobei das Protein an den Schwefel binden sollte. Als Vergleich wurde die cytoplasmatische Proteinfraction von TB1 x CP x pMAL-c2X-POL nach Expression verwendet. Damit sollte einerseits eventuell vorhandenes SBP detektiert werden. Andererseits sollten darin befindliche *E. coli*-Proteine nicht an den Schwefel binden. Beim *E. coli*-Extrakt waren viele Proteine unspezifisch am Schwefel hängen geblieben. Mit der SBP-Lösung aus *Acidianus* konnte keine Bindung an den Schwefel nachgewiesen werden (siehe Abb.72). Dies kann einerseits auf die Reste an Triton X-100 zurückzuführen zu sein, andererseits auf die totale und unwiderrufliche Denaturierung des SBP durch die Detergenz-Behandlung bei der Isolierung, wodurch eine mögliche Bindefähigkeit des SBP nicht mehr vorhanden wäre.

5 Kopienzahl des *sbp*

Da die Genom von *Acidianus* nicht vollständig sequenziert ist, konnte die Feststellung der Kopienzahl des *sbp* nur mittels Southern-Analyse erfolgen. Durch Restriktion mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, ergaben sich maximal 3 Banden, was bei allen Restriktionsenzymen auf eine dreifache Kopienzahl des *sbp* schließen ließ (siehe Abb.73). Nur durch Schließung der letzten Lücken des *Acidianus*-Genoms kann dieses Ergebnis bestätigt werden.

6 RNA-Analysen

Die Untersuchung der *sbp*-RNA durch Northern-Analyse erfolgte mittels einer DNA-Sonde (Alwine *et al.*, 1977). Während das SBP auf Proteinebene nur im Schwefelsediment nach aeroben Kulturwachstum zu finden war, wurde auf RNA-Ebene *sbp* in allen RNA's der verschieden angezogenen Zellen detektiert (siehe Abb.74). Die Größe der RNA lag dabei bei 4,4 kb. Dies ist viermal größer als erwartet. Die einzige Erklärung für die zu lange RNA ist, dass sich das SBP in einem Operon mit weiteren Genen liegt.

Während die *sbp*-RNA aus aerob mit Schwefel gewachsenen Kulturen zu allen Zeitpunkten des Wachstum gleiche Bandenstärke anzeigte, war bei der *sbp*-RNA aus anaerob mit Schwefel gewachsenen Zellen eine leichte Abschwächung der Bandenstärke im Laufe der Zeit feststellbar. Dies war auch in stärkeren Ausmaß bei der *sbp*-RNA aus aerob mit

Tetrathionat gewachsenen Zellen der Fall. In beiden Fällen (aerob + Tetrathionat und anaerob + Schwefel) scheint die *sbp*-RNA anschließend degradiert zu werden, da in beiden Fällen kein SBP auf Proteinebene gefunden wurde.

Bei Wachstum der Zellen mit Tetrathionat und Schwefel wurde erst während der exponentiellen Wachstumsphase *sbp*-RNA gebildet. Dies spricht auch für die Ergebnisse der DC, wo nachweislich bei Zellen, die mit Tetrathionat und Schwefel gewachsen waren, die beim Tetrathionat-Stoffwechsel entstehenden Polythionate (siehe V.1) durch den später stattfindenden Schwefel-Stoffwechsel abgebaut werden. Durch die RNA-Analyse kann man wie auch schon durch die GHB-Ergebnisse sagen, dass die Zellen zunächst bevorzugt Tetrathionat abbauen. Nach 48 h ist im Kulturüberstand kein Tetrathionat mehr vorhanden und die Zellen beginnen *sbp*-RNA zu produzieren, um auf den Schwefelstoffwechsel umzuschalten.

Die Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde mittels Primer-Extension durchgeführt. Dabei ergaben sich 5 mögliche Banden auf dem Sequenzgel (siehe Abb.75). Die Transkriptlänge P1 lag in der *sbp* und schied somit aus. Die Transkripte P3 und P4 lagen noch vor dem ersten Methionin und der ersten TATA-Box im contig. Das Transkript P5 lag außerhalb des contigs 275. Die Transkriptlänge P2 lag genau 27 Nt stromabwärts des TATA-Box-Motivs für PLM und war das stärkste und eindeutigste Signal. Es ist somit der wahrscheinlichste Transkriptionsstart.

Ein archaealer Promotor benötigt neben einer TATA-Box (bei ca. -27) auch ein BR-Element (*transcription factor B recognition element*), das 34 Nt stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt liegt (Reiter *et al.*, 1990; Hain *et al.*, 1992). Die Consensus-Sequenz des BR-Elementes lautet in *Sulfolobus* [A/G]N[A/T]AA[A/T]N (wobei N = beliebige Base) und besteht hauptsächlich aus zwei konservierten Adeninen (Zimmermann, 2003). Die BRE Consensus-Sequenz ist jedoch nicht sehr konserviert, so dass Abweichungen möglich sind. In der Sequenz des contigs 275 fand sich jeweils vor den TATA-Box-Motiven ein BR-Element (siehe Abb.76). Durch die Bestimmung des Transkriptionsstartes konnte nun gezeigt werden, dass die TATA-Box für die Signalsequenz PLM 27 Nt stromaufwärts des Transkriptionsstartes lag. Weiterhin war das davorliegende BRE 34 Nt entfernt.

7 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es sich beim Wachstum von *Acidianus* mit Tetrathionat nicht um die Verwertung einer Zwischenverbindung des aeroben Schwefelmetabolismus handelt, sondern um einen Stoffwechselweg, der bei *Acidianus ambivalens* bislang nicht charakterisiert war. Die Wachstumsanalysen bei Kultivierung mit Tetrathionat

und Schwefel zeigten, dass Polythionate eine wichtige Rolle bei der Schwefelmobilisierung spielen könnten. Durch räumliche Trennung von Schwefel und Zellen mittels Dialyschlauch konnte gezeigt werden, dass *Acidianus* in der Lage ist, auch ohne Kontakt zum Schwefel zu wachsen.

Im Schwefelsediment wurde ein extrazelluläres Schwefel-Binde-Protein (SBP) gefunden, welches spezifisch nur bei aeroben Wachstum der Kulturen mit Schwefel vorkam. Das SBP mit einer molekulare Masse von 34,1 kDa, war weiterhin glykosyliert, hydrophob und SBP-Proteinlösungen enthielten hohe Eisen-Konzentrationen. Ein Eisen-Schwefel-Zentrum konnte bislang nicht nachgewiesen werden. S-Layer-Isolierung zeigten, dass es sich beim SBP höchstwahrscheinlich nicht um einen S-Layer handelt. Vor dem ansequenzierten Startn des Proteins, enthält das SBP eine Signalsequenz (PLM). Bei dieser Signalsequenz handelt es sich um ein sekretorisches Signalpeptid mit zwei Lysinen als Signalsequenzmotiv und einem hydrophoben Aminosäureteil mit einer hypothetisch bestimmten α -Helix in der H-Domäne. Durch Primer-Extension wurde der Transkriptions-start des *sbp* bestimmt. Die TATA-Box für die Signalsequenz PLM liegt dabei 27 Nukleotide stromauf des Transkriptionsstartpunktes. 34 Nukleotide vom Start entfernt liegt weiterhin ein mögliches BR-Element.

Durch Northern-Analyse wurde unter allen Kultivierungsbedingungen *sbp*-RNA detektiert. Da auf Proteinebene kein SBP detektiert wurde, scheint die *sbp*-RNA beim Tetrathionat-Stoffwechsel und beim anaeroben Schwefelstoffwechsel degradiert zu werden. Die RNA war viermal größer als erwartet, was auf ein Operon schließen lässt, indem sich das *sbp* befindet. Durch Southern-Analyse wurde eine dreifache Kopienzahl des *sbp* nachgewiesen. Eine Expression in *E. coli* brachte kein Ergebnis. Dies könnte einerseits an der Inkompatibilität des SBP mit dem *E.coli*-Expressionssystem liegen, andererseits an dem fehlenden Aufbau wichtiger Zentren (bspw. eines Eisenzentrums). Hier könnte mit dem pRKisc-Vektor als zusätzliches Hilfsplasmid Abhilfe geschaffen werden.

Durch Herstellung eines *sbp*-Antikörpers könnte auch in der Zelle nach SBP-Präproteinen gesucht werden und die Verteilung des Proteins bestimmt werden. Zur Antikörperproduktion müsste jedoch mehr oder weniger gereinigtes SBP in größeren Mengen vorliegen. Da jedoch selbst mit Silberfärbung keine anderen Proteine detektiert werden konnten, wäre eine Reinigung von SBP-Lösungen vielleicht sogar unnötig.

Da die SBP-Sequenz bekannt ist, könnte man auch Antikörper gegen geeignete Peptidsequenzen herstellen. Diese Anti-Peptid-Antikörper ermöglichen die Reinigung des Proteins und geben Aufschluss über Struktur und Faltung des Proteins, insofern die im SBP vorhandenen Zuckerketten die Bindestelle des Antikörpers nicht verdecken (Rehm, 2002a). Da die möglichen Bindestellen der Zucker über GlycoMod berechnet wurden, kann versucht werden, diesen Sequenzteil außer Acht zu lassen.

Über ortsgerichtete Mutagenese könnte man die Bindestellen möglicher Liganden detektieren. Dazu bräuchte man jedoch ein Expressionssystem, bei dem natives Protein produziert würde.

Weiterhin wäre ein Funktionstest von Nöten bei dem die Funktion von SBP eindeutig bewiesen werden könnte. Dabei müsste jedoch zunächst eine Methode zur Isolierung von nativem Protein gefunden werden, da auch durch die Isolierung mittels Detergenzien das Protein nicht mehr nativ vorlag. Eine Hoffnung ist dabei die Expression in *Sulfolobus*, wo unter nativen Bedingungen das Protein richtig gefaltet werden könnte.

Ein weiterer Nachweis zur Funktion könnte mittels Tetrathionat-adaptierten Zellen stattfinden. Tetrathionat-adaptierte *Acidianus*-Zellen sind nur schwer in der Lage mit Schwefel zu wachsen. Wenn man diesen Zellen Schwefel und gereinigte SBP-Lösung mit nativem Protein ins Medium geben würde, müssten die Zellen wieder in der Lage sein mit Schwefel zu wachsen. Sind sie es nicht, müssten noch andere Cofaktoren eine Rolle spielen.

Über den Nachweis von Thiolgruppen (Lottspeich & Zorbas, 1998a) könnte man nach Disulfidbrücken im Protein suchen, die unter Umständen einen Ansatz zur Reinigung des Proteins über thiolbindende Säulen bieten könnten.

Wichtig wäre es selbstverständlich, die Sequenzen im *Acidianus*-Genom vor und nach dem contig275 zu bestimmen, um eine Aussage über mögliche Operons treffen zu können.

Durch XANES-Analysen (X-ray-absorption spectroscopy) könnte versucht werden den mobilisierten Schwefel zu analysieren. Die quantitative Bestimmung der vorhandenen Schwefeltypen ist jedoch sehr abhängig von der Wahl des Referenzspektrums und es kommt es leicht zur Artefaktbildung (George *et al.*, 2002).

Zu guter Letzt stünde natürlich die Kristallisierung des Proteins an, wenn alle oben genannten Versuche erfolgreich beendet wären.

VI Abkürzungen

Abb	Abbildung	mcs	multiple cloning site
abs.	absolut	MeOH	Methanol
Aca	<i>Acidianus ambivalens</i>	M9Y	Minimalmedium
ad	auffüllen auf	MOPS	3-[N-Morpholino-]propansulfonsäure
AK	Antikörper	NiFe	Nickel-Eisen
AM	Acidianus-Medium ohne verwertbare Schwefelverbindungen	O	SBP-Protein ohne Leader
Amp	Ampicillin	oD	optische Dichte [nm]
APS	Ammonium-Persulfat	OG	Octylglycosid
ASV	anorganische Schwefelverbindung(en)	ORF	origin of replication
ATP	Adenosintriphosphat	p	pMAL-p2X-Vektor
AÜ	Kulturüberstand von <i>Acidianus</i>	p.a.	zur Analyse
β-ME	β-Mercaptoethanol	PA	Polyacrylamid
BL21	<i>E. coli</i> -BL21-Zellen	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
bp	Basenpaare	PdCl ₂	Palladiumchlorid
BSA	Rinderserumalbumin	pl	isoelektrischer Punkt
c	pMAL-c2X-Vektor	PLK	SBP-Protein mit kurzem Leader
CB	Colum buffer	PLL	SBP-Protein mit langem Leader
CBD	Chitin Binde Domäne	PLM	SBP-Protein mit mittlerem Leader
CBM	Colum Buffer mit Maltose	PSR	Polysulfidreduktase
Chlo	Chloramphenicol	POL	SBP-Protein ohne Leader
CP	CodonPlus-Hilfsplasmid	PP	Periplasma
CSPD	Chemolumineszenzsubstrat	PP-Puffer	Periplasmatischer Puffer
Da	Dalton	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie	RCF	Erdbeschleunigung in g
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	RNase	Ribonuclease
DIG	Digoxigenin	rpm	Umdrehungen pro Minute
DM	Dodecylmaltosid	RT	Zimmertemperatur (25° C)
DMSO	Dimethylsulfoxid	S°	elementarer Schwefel (S ₈)
dNTP	Desoxy-Nucleotid-Triphosphat	SB	LB-Medium mit Glucose
DOC	Natriumdesoxycholat	SBP	Schwefel-Binde-Protein
DTT	1,4-Dithiotreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
e	pET28c-Vektor	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
E	Extinktion	SL	S-Layer-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SL-Puffer	S-Layer-Puffer
EF	Entfaltungspuffer	SR	Schwefelreduktase
EPR	Elektronenspinchromatographie	ST	Schwefel+Tetrathionat
EtOH	Ethanol	t	pTYB4-Vektor
Fe	Eisen	TA	erst Tetrathionat und nach 48 h Zugabe von Schwefel
FeS	Eisen-Schwefel	TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
GHB	Gehaltsbestimmung(en)	Tab.	Tabelle
HPLC	high performance liquid chromatography	TB1	<i>E. coli</i> -TB1-Zellen
IPTG	Isopropylthiogalactosid	TbpE	TATA-Box-Binde-Protein
K	SBP-Protein mit kurzem Leader	TCA	Trichloressigsäure
kb	Kilobasenpaare	t _D	Verdopplungszeit in h
kDa	Kilo-Dalton	TE	Puffer aus Tris und EDTA
KPi	Mischung aus KH ₂ PO ₄ und K ₂ HPO ₄	TEMED	Tetramethylethylen-diamin
l	Länge in cm	TopF10'	<i>E. coli</i> -TopF10'-Zellen
L	SBP-Protein mit langem Leader	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
LB	Lucia Bertani-Medium	Triton X-100	Octyl-Phenoxy-Polyethoxy-Ethanol
λ	Wellenlänge in nm	TS	Thiosulfat
M	SBP-Protein mit mittlerem Leader	TT	Tetrathionat
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight	TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurant
mal E	Gen des Maltose-Binde-Proteins	UE	Untereinheit(en)
MBP	Maltose-Binde-Protein	ÜNK	Über-Nacht-Kultur
		μ	Wachstumskonstante [h ⁻¹]

VII Literaturverzeichnis

- AHN, T.YIM, SK., CHOI, HI. & YUNT, CH. (2001):** Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. – *Anal. Biochem.* 291: 300 – 303.
- AKCA, E., CLAUS, H., SCHULTZ, N., KARBACH, G., SCHLOTT, B., DEBAERDEMAEKER, T., DECLERCQ, JP. & KÖNIG, H. (2002):** Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic and extremely thermophilic methanococci. – *Extremophiles* 6: 351 – 358.
- ALBERS, SV. & DRIESSEN, AJM. (2005):** Analysis of ATPases of putative secretion operons in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. – *Microbiol.* 151: 763 – 773.
- ALBRECHT, T. (2004):** Expression von Genen aus dem Schwefelmetabolismus von *Acidianus ambivalens* in dem verwandten *Sulfolobus solfataricus*. – Diplomarbeit Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 129 Seiten.
- ALEXANDER, S. & ELDER, J. (1989):** Endoglycosidases from *Flavobacterium meningosepticum* application to biological problems. – *Methods Enzymol.* 179: 505 – 518.
- ALFREDSSON, GA., INGASON, A. & KRISTJANSSON, JK. (1986):** Growth of thermophilic obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria on thio-sulfate. – *Lett. Appl. Microbiol.* 2: 21 – 24.
- ALTMAN, E., BRISSON, JR., MESSNER, P., SLEYTR, UB. (1990):** Chemical characterization of the regularly arranged surface layer glycoprotein of *Clostridium thermosaccharolyticum* D120 – 70. – *Eur. J. Biochem.* 188: 73 – 82.
- ALTMAN, E., BRISSON, JR., GAGNÉ, SM., KOLBE, J., MESSNER, P., SLEYTR, UB. (1992):** Structure of the glycan chain from the surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* L77– 66. – *Biochim. Biophys. Acta* 1117: 71 – 77.
- ALWIN, JC., KEMP, DJ. & STARK, GR. (1977):** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350 – 5354.
- AMINUDDIN, M. & NICHOLAS, DJD. (1974):** An AMP-independent sulfite oxidase from *Thiobacillus denitrificans*. – *J. Gen. Microbiol.* 82: 103 – 113.
- ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, SN. (1985):** Theory of protein solubility. – *Meth. Enzymol.* 114: 49 – 77.
- ARAGNO, M. (1991):** Aerobic chemolithoautotrophic thermophilic bacteria. – In: *Thermophilic Bacteria* (JK.Kristjansson, ed.), CRP Press, Boca Raton: 77 – 103.
- ARAGNO, M. & SCHLEGEL, HG. (1978):** *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 112 – 116.
- AULING, G., REH, M., LEE, CM. & SCHLEGEL, HG. (1978):** *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria: ist differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, Gram-negative, hydrogen-oxidizing species. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 82 – 95.
- AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, DD., SEIDMAN, JG., SMITH, JA. & STRUHL, K. (1998):** *Curr. Prot. Mol. Biol.*, Green Publishing Associates an Wiley-Interscience, NY.
- BÄUMLER, J. & RIPPSTEIN, S. (1961):** Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Insektiziden. – *Helvet. Chim. Acta* 44: 1162 – 1164.
- BARRETT, EL. & CLARK, MA. (1987):** Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. – *Microbiol. Rev.* 51: 192 – 205.
- BELDER, J., NGUYEN-DISTECHE, M., HOUBEHERIN, N., GHUYSEN, J.M., MARUYAMA, I.N., HARA, H., HIROTA, Y. & INOUE, M. (1988):** Overexpression, solubilization and refolding of a genetically engineered derivative of the penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* K12. – *Mol. Microbiol.* 2: 519 – 525.
- BERKS, BC., SARGENT, F. & PALMER, T. (2000):** The Tat protein export pathway. – *Mol. Microbiol.* 35: 260 – 274.
- BEUTLER, HO. (1984):** In *Meth. Enzym. Anal.* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd. ed., Vol. VI, pp. 104 – 112, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
- BOCK, K., SCHUSTER-KOLBE, J., ALTMAN, E., ALLMAIER, G., STAHL, B., CHRISTIAN, R., SLEYTR, UB. & MESSNER, P. (1994):** Primary structure of the O-glycosidically linked glycan chain of the crystalline surface layer glycoprotein of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111 - 69. – *J. Biol. Chem.* 269: 7137 – 7144.
- BONJOUR, F. & ARAGNO, M. (1986):** Growth of thermophilic, obligatorily chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria related to *Hydrogenobacter* with thiosulfate and elemental sulfur as electron and energy source. – *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 11 – 15.
- BOULÈGUE, J. (1978):** Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. – *Phosphorus Sulfur* 5: 127 – 128.

- BOWEN, T.J., HAPPOLD, F.C. & TAYLOR, B.F. (1966):** Studies on adenosine-5'-phosphosulfate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. – Biochim. Biophys. Acta 975: 189 – 221.
- BRADFORD, MM. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. – Anal. Biochem. 72: 248 – 254.
- BRÖCKL, G., BEHR, M., FABRY, S., HENSEL, R., KAUDEWITZ, H., BIENDL, E. & KÖNIG, H. (1991):** Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermobacter fervidus* and *Methanothermobacter sociabilis*. – Eur. J. Biochem. 199: 147 – 152.
- BRÖTZ, H., BIERBAUM, G., LEOPOLD, K., REYNOLDS, P.E. & SAHL, H.G. (1998):** The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. – Antimicrob. Agents Chemoth. 42 (1): 154– 160.
- BROCK, T.D., BROCK, K.M., BELLY, R.T., WEISS, R.L. (1972):** *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing Bacteria living at low pH and high temperature. – Arch. Microbiol. 84: 54 – 68.
- BURGER, E. & BERNINGER, H. (1958):** Paper chromatographic and spectrometric demonstration of phenothiazine derivatives under toxicological conditions. – Arch. Toxic. 17: 77 – 92.
- BURNETTE, WH. (1981):** Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. – Anal. Biochem. 112: 195 – 203.
- CHAN, C. & SUZUKI, I. (1993):** Quantitative extraction and determination of elemental sulfur an stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. – Can. J. Microbiol. 39: 1166 – 1168.
- CHANDRA, TS. & FRIEDRICH, C. (1986):** Tn5-induced mutations affecting sulfur-oxidizing ability (Sox) of *Thiosphaera pantotropha*. – J. Bacteriol. 166: 446 – 452.
- CHAPMAN, JR. (1996):** Protein and peptide analysis by mass spectrometry. – Humana Press Totowa, New Jersey.
- CHARLES, AM. & SUZUKI, I. (1966):** Purification and properties of sulfite: cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. – Biochim. Biophys. Acta 128: 522 – 534.
- CHENG, YC., PENG, RY., SU, JCC. & LO, DY. (1999):** Mechanism and kinetics of elemental sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* in batch fermenter. Environ. Technol. 20:933–942.
- CHOI, MH., KIM, JY. & CHUNG, BC. (1999):** Determination of testosterone: episterone ratio after pentafluorophenyldimethylsilyl-trimethylsilyl derivatisation using gas chromatography-mass spectrometry in equine urine. – The Analyst 124: 675– 678.
- CHOI, MH., KIM, KR. & CHUNG, BC. (2000):** Simultaneous determination of urinary androgen glucuronides by high temperature gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. – Steroids 65: 54 – 59.
- CLINE, E. (1969):** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. – Limnol. Oceanogr. 14: 454 – 458.
- CONRAD, S. (2003):** Bioinformatische Identifizierung von Hydrogenase-Genen im Genom von *Acidianus ambivalens* und Schließung von Lücken im Sequenzdatenbestand. – Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 90 Seiten.
- COOPER, CA., GASTEIGER E., PACKER N. (2001):** GlycoMod – A software Tool for Determining Glycosylation Compositions from Mass Spectrometric Data. – Proteomics 1: 340 – 349.
- COOPER, CA., GASTEIGER E., PACKER N. (2003):** Predicting Glycan Composition from Experimental Mass Using GlycoMod. – In: Handbook of Proteomic Methods (Conn P.M. ed.), Humana Press, Totowa, NJ: 225 – 232.
- CYPIONKA, H. & PFENNIG, N. (1986):** Growth yields of *Desulfotomaculum orientis* with hydrogen in chemostat culture. – Arch. Microbiol. 143: 396 – 399.
- DAHL, C.(1996):** Insertional gen inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. – Microbiol. 142: 3363 – 3372.
- DAS, SK. & MISHRA, AK. (1996):** Transposon mutagenesis affecting thiosulfate oxidation in *Bosea thiooxidans*, a new chemolithoheterotrophic bacterium. J. Bacteriol. 178: 3628 – 3633.
- DAS, SK., MISHRA, AK., TINDALL, BJ., RAINEY, FA. & STACKEBRANDT, E. (1996):** Oxidation of thiosulfate by a new bacterium *Bosea thiooxidans* (strain B1-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. – Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 981 – 987.
- DE VRIJE, GJ., BATENBURG, AM., KILIAN, JA. & DE KRUIJFF, B. (1990):** Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. – Mol. Microbiol. 4: 143 – 150.
- DOLATA, MM., VAN BEEUMEN, JJ., AMBLER, RP., MEYER, TE. & CUSANOVICH, MA. (1993):** Nucleotide sequence of the haem subunit of flavocytochrome c from the purple phototrophic bacterium, *Chromatium vinosum*. – J. Biol. Chem. 19: 14426 – 14431.

- DOPSON, M., LINDSTRÖM, EB. & HALLBERG, KB. (2002):** ATP generation during inorganic sulfur compound oxidation by *Acidithiobacillus caldus* is exclusively due to electron transport phosphorylation. – *Extremophiles* 6(2): 123 – 129.
- ECCLESTON, M. & KELLY, DP. (1978):** Oxidation kinetics and chemostat growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* on tetrathionate and thiosulfate. – *J. Bacteriol.* 134 (3): 718 – 727.
- ECKERT, WA. & KARTENBECK, J. (1997):** Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. – Springer Labor Manual, 275 Seiten.
- EDMANN, P. & BEGG, G. (1967):** A protein sequenator. – *Eur. J. Biochem.* 1: 80 – 91.
- ELDER, J. & ALEXANDER, S. (1992):** Endo- β -N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:M 4540 – 4544.
- EMMEL, T., SAND, W., KÖNIG, WA. & BOCK, E. (1986):** Evidence for the existence of a sulphur oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. – *J. Gen. Microbiol.* 132: 3415 – 3420.
- FISCHER, DS. & PRICE, DC. (1964):** A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazin. – *Clinic. Chem.* 10: 21 – 31.
- FÖRSTER, F. & CENTNER, K. (1926):** Beiträge zur Kenntnis der schwefligen Säure und ihrer Salze. IV. Über die Einwirkung der schwefligsauren Salze auf Polythionate. – *Z. anorg. allg. Chem.* 157: 45 – 82.
- FRIEDRICH, CG. & MITRENGA, G. (1981):** Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. – *FEMS Microbiol. Lett.* 10: 209 – 212.
- FRIEDRICH, CG. (1998):** Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. – *Adv. Microb. Physiol.* 39: 235 – 289.
- FUCHS, T., HUBER, H., BURGGRAF, S. & STETTER, KO. (1996):** 16S rDNA based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. – *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 56 – 60.
- FUKUMORI, YP. & YAMANAKA, I. (1979):** Flavocytochrome c of *Chromatium vinosum*. Some enzymatic properties and subunit structure. – *J. Biochem. Tokyo* 85: 1405 – 1414.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS MR., APPEL RD. & BAIRIOCH A. (2005):** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. – (In) John M. Walker (ed): *The Proteom. Prot. Handbook*, Humana Press: pp. 571 – 607.
- GATTIKER, A., BIENVENUT WV., BAIRIOCH A. & GASTEIGER E. (2002):** FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. – *Proteom.* 2: 1435 – 1444.
- GEORGE, GN., PICKERING, IJ., YU, EY. & PRINCE, RC. (2002):** X-ray absorption spectroscopy of bacterial sulfur globules. – *Microbiol. Comment* 148: 2267 – 2268.
- GERKEN, TA., GUPTA, R. & JENTOFT, N. (1992):** A novel approach for chemically deglycosylating o-linked proteins. The deglycosylation of submaxillary and respiratory mucins. – *Biochem.* 31: 639 – 648.
- Giggenbach, W. (1972):** Optical spectra and equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solution at 20° C. – *Inorg. Chem* 11: 1201 – 1207.
- GILL, S. & HIPPEL, P. (1989):** Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequences. – *Anal. Biochem.* 182: 319 – 326.
- GOA, J. (1953):** A micro-biuret methods for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. – *Skand. J. Clin. Lab. Invest.* 5: 218 – 222.
- GROGAN, DW. (1989):** Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. – *J. Bacteriol.* 171: 6710 – 6719.
- GUERRERO, R., MAS, J. & PEDRÓS-ALIÓ, C. (1984):** Buoyant density changes due to intercellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. – *Arch. Microbiol.* 137: 350 – 356.
- GUERRERO, R., MONTESINOS, E., PEDRÓS-ALIÓ, C., ESTEVE, I., MAS, J., VAN GEMERDEN, H., HOFMAN, PAG. & BAKKER, JF. (1985):** Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. – *Limnol. Oceanogr.* 30: 919 – 931.
- GÜLTEKIN, H. & HEERMANN, KH. (1988):** The use of polyvinylidene difluoride membranes as a general blotting matrix. – *Anal. Biochem.* 172: 320 – 329.
- HAGEAGE, GJ., JR., EANES, ED. & GHERNA, RL. (1970):** X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by *Chromatium* species. – *J. Bacteriol.* 101: 464 – 469.
- HAIN, J., REITER, WD., HÜDEPOHL, U. & ZILLIG, W. (1992):** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. – *Nuc. Acids Res.* 20: 5423 – 5428.
- HALLBERG, KB. & LINDSTRÖM, EB. (1994):** Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov. a moderately thermophilic acidophile. – *Microbiol.* 140: 3451 – 3456.

- HALLBERG, KB. & LINDSTRÖM, EB. (1996):** Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. – J. Bacteriol. 178: 6 – 11.
- HANAHAN, D., JESSEE, J. & BLOOM, F.R. (1991):** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. – Meth. Enzymol. 204: 63 – 113.
- HANISCH, FG., JOVANOVIĆ, M. & PETER-KATALINIĆ, J. (2001):** Glycoprotein identification and localization of o-glycosylation sites by mass spectrometric analysis of deglycosylated/alkaminylated peptide fragments. – Anal. Biochem. 290: 47 – 59.
- HEDDERICH, R., KLIMMEK, O., KRÖGER, A., DIRMEIER, R., KELLER, M. & STETTER, K.O. (1999):** Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. – FEMS Microbiol. Rev. 22: 353 – 381.
- HENSEL, M., HINSLEY, AP., NIKOLAUS, T., SAWERS, G. & BERKS, BC. (1999):** The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella thyphimurium*. – Mol. Microbiol. 32(2): 275 – 287.
- HERRIN, DL. & SCHMIDT, GW. (1988):** Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. – BioTechniques 6: 196 – 200.
- HEUMÜLLER, S. (2004):** Versuche zum *Gene silencing* auf RNA-Ebene in dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. – Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 86 Seiten.
- HINSLEY, AP. & BERKS, BC. (2002):** Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enteritica*. – Microbiol. 148: 3631 – 3638.
- HORTIN, G. & TIMPE, B. (1990):** Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides application of jacalin-agarose. – Analyt. Biochem. 188: 271 – 277.
- HUBER, R., WILHARM, T., HUBER, D., TRINCONE, A., BURGGRAF, S., KÖNIG, H., RACHEL, R., ROCKINGER, I., FRICKE, H. & STETTER, OK. (1992):** *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. – System. Appl. Microbiol. 15: 340 – 351.
- HUBER, H., HOHN, MJ., RACHEL, R., FUCHS, T., WIMMER, VC. & STETTER, KO. (2002):** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. – Letter to Nature: 417: 63
- HUDSON, JA., DANIEL, RM. & MORGAN, HW. (1988):** Isolation of a strain of *Bacillus schlegelii* from geothermally heated antarctic soil. – FEMS Microbiol. Lett. 51: 57 – 60.
- IMHOFF, JT. (1989):** Genus *Ectothiorhodospira* Pelsh. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology 3 (IA. Staley, MP. Bryant, N. Pfennig & JG. Holt, eds), Williams & Wilkins, Baltimore: 1654 – 1658.
- JONUSCHEIT, M., MARTUSEWITSCH, E., STEDMAN, KM. & SCHLEPER, C. (2003):** A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle. – Mol. Microbiol. 48: 1241 – 1252.
- KAMIMURA, K., HIGASHINO, E., MORIYA, S. & SUGIO, T. (2003):** Marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium requiring salts for the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds. – Extremophiles 7: 95 – 99.
- KÄRCHER, U., SCHRÖDER, H., HASLINGER, E., ALLMAIER, G., SCHREINER, R., WIELAND, F., HASELBECK, A. & KÖNIG, H. (1993):** Primary structure of the heterosaccharide of the surface glycoprotein of *Methanothermobacter fervidus*. – J. Biol. Chem. 268: 26821 – 26826.
- KELLY, DP. & HARRISON, AP. (1989):** Genus *Thiobacillus* Beijerinck. – In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3 (IA. Staley, MP. Bryant, N. Pfennig & JG. Holt, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore: 1842 – 1858.
- KELLY, DP., CHAMBERS, LA. & TRUDINGER, PA. (1969):** Cyanolysis and spectrophotometric determination of trithionate in mixtures with thiosulfate and tetrathionate. – Anal. Chem. 41: 898 – 901.
- KIJIMOTO-OCHIAI, S., KATAGIRI, YU. & OCHIAI, H. (1985):** Analysis of N-linked oligosaccharide chains of glycoproteins on nitrocellulose sheets using lectin-peroxidase reagents. – Analyt. Biochem. 147: 222 – 229.
- KING, TE. & MORIS, RO. (1967):** Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. – Meth. Enzymol.: Oxidation and Phosphorylation, Volume X: 634 – 641.
- KLAPPER, MH. (1977):** The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. – Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1018 – 1024.
- KLETZIN, A., URICH, T., MÜLLER, F., BANDEIRAS, TM. & GOMES, CM. (2004):** Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic Archaea. – J. Bioenerg. Biomemb. 36: 77 – 91.
- KLIMMEK, O. (2004):** In: Biospektrum Sonderheft: VAAM Frühjahrstagung 2004, pp 63 Braunschweig, Germany: Elsevier, Heidelberg
- KODAMA, A. (1969):** Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium VI. Fractionation and reconstruction of the elementary sulfur-oxidizing system of *Thiobacillus thiooxidans*. – Plant Cell Physiol. 10: 645 – 655.
- KONRAD, Z. & EICHLER, J. (2002):** Protein glycosylation in *Haloferax volcanii*: partial

characterization of a 98-kDa glycoprotein. – FEMS Microbiol. Lett. 209: 197 – 202.

KUROSAWA, N., ITOH, YH., IWAI, T., SUGAI, A., UDA, I., KIMURA, N., HORIUCHI, T. & ITOH, T. (1998): *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. – Int. J. Syst. Bact. 48: 451 – 456.

KUSAI, A. & YAMANAKA, T. (1973a): Cytochrome c (553, *Chlorobium thiosulfatophilum*) is a sulfide-cytochrome c reductase. – FEBS Lett. 34: 235 – 237.

KUSAI, A. & YAMANAKA, T. (1973b): The oxidation mechanism of thiosulfate and sulfide in *Chlorobium thiosulfatophilum*: roles of cytochrome c-551 and cytochrome c-553. – Biochim. Biophys. Acta 325: 304 – 314.

KYHSE-ANDERSEN, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. – J. Biochem. Biophys. Meth. 10: 203 – 209.

LANGSFORD, ML., GILKES, NR., SINGH, B., MOSER, B., MILLER JR., RC., WARREN, RAJ. & KILBURN, DG. (1987): Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. – FEBS Lett. 225: 163 – 167.

LASKA, S., LOTTSPEICH, F., KLETZIN, A. (2003): Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. – Microbiol. 149: 2357 – 2371.

LASKA, S. (2000): Schwefelatmung in den extrem thermophilen Archaea *Acidianus ambivalens* und *Thermoproteus*. – Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 174 Seiten.

LAUBER, K. (2002): Genexpression und Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Proteinen aus *Acidianus ambivalens* in *Escherichia coli*. – Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 124 Seiten.

LECHNER, J. & WIELAND, F. (1989): Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. – Ann. Rev. Biochem. 58:173 – 194.

LEWIS, LO., YOSTEN, AA., MURRAY, RGE. (1987): Characterization of the surface protein layers of the mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. – J. Bacteriol. 169: 72 – 79.

LIN, YJ., DANCEA, F., LÖHR, F., KLIMMEK, O., PFEIFFER-MAREK, S., NILGES, M., WIENK, H., KRÖGER, A. & RÜTERJANS, H. (2004): Solution structure of the 30 kDa polysulfide-sulfur transferase homodimer from *Wolinella succinogenes*. – Biochem. 43: 1418 – 1424.

LOTTSPEICH, F. & ZORBAS, H. (1998a): Bioanalytik. – 1. Aufl., Spektrum, Heidelberg, Kap.I: 9 – 368.

LOTTSPEICH, F. & ZORBAS, H. (1998b): Bioanalytik. – 1. Aufl., Spektrum, Heidelberg, Kap.IV: 571 – 778.

LU, WP. & KELLY, DP. (1983): Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus A2*. – J. Gen. Microbiol. 129: 3549 – 3564.

LU, WP. & KELLY, DP. (1984): Properties and role of sulphite: cytochrome c oxidoreductase purified from *Thiobacillus versutus* (A2). – J. Gen. Microbiol. 130: 1683 – 1692.

LU, WP. & KELLY, DP. (1988): Cellular location and partial purification of the 'thiosulfate-oxidizing enzyme' and 'trithionate hydrolase' from *Thiobacillus tepidarius*. – J. Gen. Microbiol. 134: 877 – 886.

MADIGAN, MT., MARTINKO, JM. & PARKER, J. (2001a): Brock Mikrobiologie. – Spektrum, Heidelberg, 9. Aufl., Deckel hinten.

MADIGAN, MT., MARTINKO, JM. & PARKER, J. (2001b): Brock Mikrobiologie. – Spektrum, Heidelberg, 9. Aufl., Kap.16: 715 – 801.

MAINA, C.V., RIGGS, P.D., GRANDEA III, A.G., SLATKO, B.E., MORAN, L.S., TAGLIAMONTE, J.A., MCREYNOLDS, L.A. & DIGUAN, C. (1988): An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. – Gene 74: 365 – 373.

MALEY, F., TRIMBLE, RB., TARENTINO, AL. & PLUMMER, TH. JR. (1989): Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. – Analyt. Biochem. 180: 195 – 204.

MAS, J., PEDRÓS-ALIÓ, C. & GUERRERO, R. (1985): Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms. – J. Bacteriol. 164: 749 – 756.

MAS, J. & VAN GEMERDEN, H. (1987): Influence of sulfur accumulation and composition of sulfur globule on cell volume and buoyant density of *Chromatium vinosum*. – Arch. Microbiol. 146: 362 – 369.

MENGELE, R. & SUMPER, M. (1992): Drastic differences in glycosylation of related S-layer glycoproteins from moderate and extreme halophiles. – J. Biol. Chem. 267: 8182 – 8185.

MESSNER, P. & SLEYTR, UB. (1988): Asparaginyl-rhamnose: a novel type of protein-carbohydrate linkage in a eubacterial surface-layer glycoprotein. – FEBS Lett. 228: 317 – 320.

- Messner, P., Bock, K., Christian, R., Schulz, G. & Sleytr, UB. (1990):** Characterization of the surface layer glycoprotein of *Clostridium symbiosum* HB25. – J. Bacteriol. 172: 2576 – 2583.
- MESSNER, P., CHRISTIAN, R., KOLBE, J., SCHULZ, G. & SLEYTR, UB. (1992):** Analysis of a novel linkage unit of O-linked carbohydrates from the crystalline surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* S102 – 70. – J. Bacteriol. 174: 2236 – 2240.
- MESSNER, P., SCHUSTER-KOLBE, J., SCHÄFFER, C. & SLEYTR, UB. (1993):** Glycoprotein nature of select bacterial S layers. – In: Beveridge TJ, Koval SF (eds) Advances in bacterial paracrystalline surface layers. Plenum, New York: 119 – 128.
- MESSNER, P., CHRISTIAN, R., NEUNINGER, C. & SCHULZ, G. (1995):** Similarity of "core" structures in two different glycans of tyrosine-linked eubacterial S-layer glycoproteins. – J. Bacteriol. 177: 2188 – 2193.
- MEULENBERG, R., PRONK, JT., FRANK, J., HAZEU, W., BOS, P. & KUENEN, JG. (1992):** Purification and partial characterization of a thermostable trithionate hydrolase from the acidophilic sulphur oxidizer *Thiobacillus acidophilus*. – Eur. J. Biochem. 209: 367 – 374.
- MEULENBERG, R., PRONK, JT., HAZEU, W., VAN DIJKEN, JP., FRANK, J., BOS, P. & KUENEN, JG. (1993):** Purification and partial characterization of a thermostable thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. – J. Gen. Microbiol. 139: 2033 – 2039.
- MOZDZNOWSKI, J., HEMBACH, P. & SPEICHER, DW. (1992):** High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. – Electrophoresis 13: 59 – 64.
- MOENS, S. & VANDERLEYDEN, J. (1997):** Glycoproteins in prokaryotes. – Arch. Microbiol. 168: 169 – 175.
- MONTELARO, RC. (1987):** Protein antigen purification by preparative protein blotting. – Electrophoresis 8: 432 – 438.
- MORT, A. & LAMPORT, DT. (1977):** Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. – Analyt. Biochem. 82: 289 – 309.
- MORTIMER, CE. (1996):** Chemie. Das Basiswissen der Chemie. – Thieme, Stuttgart, 6. Aufl., Kap.24: 405 – 421.
- MÜLHARD, C. (2003):** Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. – Spektrum, Heidelberg, 4 Aufl., Kap.3: 42 – 72.
- MÜNCHOW, V. & STEUDEL, R. (1994):** The decomposition of aqueous dithionite and its reaction with polythionates $S_nO_6^{2-}$ ($n = 3-5$) studied by ion-pair chromatography. – Z. anorg. allg. Chem. 620: 121 – 126.
- MUNK, K. (2001):** Grundstudium Biologie. Mikrobiologie. – Spektrum, Heidelberg, 1. Aufl., Kap.11: 11-1 – 11-48.
- NAKAMURA, K., YOSHIKAWA, H., OKUBO, S., KUROSAWA, H. & AMANO, Y. (1995):** Purification and properties of membrane-bound sulfite dehydrogenase from *Thiobacillus thiooxidans* JCM7814. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 11 – 15.
- NAKAMURA, S., AONO, R., MIZUTANI, S., TAKASHINA, T., GRANT, WD. & HORIKOSHI, K. (1992):** The cell surface glycoprotein of *Haloarcula japonica* TR-1. – Biosci. Biotech. Biochem. 56: 996 – 998.
- NOR, YM. & TABATABAI, MA. (1975):** Colorimetric determination of microgram quantities of thiosulfate and tetrathionate. – Analytical Letters 8: 537 – 547.
- OHMURA, N., TSUGITA, K., KOIZUMI, JI. & SAIKI, H. (1996):** Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. – J. Bacteriol. 178 (19): 5776 – 5780.
- Olsen, O. & Thomsen, KK. (1991):** Improvement of bacterial β -glucanase thermostability by glycosylation. – J. Gen. Microbiol. 137: 579 – 585.
- OLTMANN, LF. & STOUTHAMER, AH. (1975):** Reduction of tetrathionate, trithionate and thiosulphate, and oxidation of sulphide in *Proteus mirabilis*. – Arch. Microbiol. 105 (2): 135 – 142.
- PACHMAYR, F. (1960):** Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. – Dissertation Universität München.
- PETERS, J., NITSCH, M., KÜHLMORGEN, B., GOLBIK, R., LUPAS, A., KELLERMANN, J., ENGELHARDT, H., PFANDER, JP., MÜLLER, S., GOLDIE, K., ENGEL, A., STETTER, KO. & BAUMEISTER, W. (1995):** Tetra-brachion: a filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and stability. – J. Mol. Biol. 245: 385 – 401.
- PETERS, J., PETERS, M., LOTTSPEICH, F., SCHÄFER, W. & BAUMEISTER, W. (1987):** Nucleotide sequence analysis of the gene encoding the *Deinococcus radiodurans* surface protein, derived amino acid sequence, and complementary protein chemical studies. – J. Bacteriol. 169: 5216 – 5223.
- PETERS, J., RUDOLF, S., OSCHKINAT, H., MENGELE, R., SUMPER, M., KELLERMANN, J., LOTTSPEICH, F. & BAUMEISTER, W. (1992):** Evidence for tyrosine-linked glycosaminoglycan in a bacterial surface protein. – Biol. Chem. Hoppe Seyler 373: 171 – 176.

- PETUSHKOVA, YP. & IVANOVSKY, RN. (1976):** Respiration of *Thiocapsa roseopersicina*. – Mikrobiologiya 45: 9 – 15.
- PLUSKAL, MG., PRZEKOP, MB. & KAVONIAN, MR. (1986):** ImmobilonTM PVDF transfer membrane. A new membrane substrate for Western blotting of proteins. – BioTechniques 4: 272 – 283.
- PORATH, U., PAZMANDY, K., PLUECKTHUN, H. & SCHREIER K. (1960):** Investigations on the half-life of serum albumin which was isolated by precipitation with neutral salts or with TCA. – Clin. Chim. Acta 5: 54 – 58.
- PRANGE, A., DAHL, C., TRÜPER, HG., BEHNKE, M., HAHN, J., MODROW, H. & HORMES, J. (2002a):** Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy. – Eur. Phys. J. D 20: 589 – 596.
- PRANGE, A., DAHL, C., TRÜPER, HG., CHAUVISTRÉ, R., MODROW, H. & HORMES, J. (2002b):** X-ray absorption spectroscopy of bacterial sulfur globules. a detailed reply. – Microbiol. Comment 148: 2268 – 2270.
- PUGSLEY, AP. (1993):** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. – Microbiol. Rev. 57: 50 – 108.
- PUM, D., NEUBAUER, A., GYÖRVARY, E., SÁRA, M. & SLEYTR, UB. (2000):** S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit. – Nanotechn. 11: 100 – 107.
- RADEMAKER, G. J. & THOMAS-OATES, J. (1996):** Analysis of glycoproteins and glycopeptides using fast-atom bombardment. In Methods in Molecular Biology (Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry); Chapman J. R., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 61: 231 – 241.
- RADEMAKER, GJ., PERGANTIS, SA., BLOK-TIP, L., LANGRIDGE, JL., KLEEN, A. & THOMAS-OATES, JE. (1998):** Mass spectrometric determination of the sites of o-glycan attachment with low picomolar sensitivity. – Analyt. Biochem. 257: 149 – 160.
- REHM, H., WIEDENMANN, B. & BETZ, H. (1986):** Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium binding protein of the synaptic vesicle membrane. – EMBO J. 5: 535 – 541.
- REHM, H. (1989):** Enzymatic deglycosylation of the dendrotoxin binding protein. – FEBS Lett. 247: 28 – 30.
- REHM, H. (2002a):** Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. – Spektrum, 4. Aufl., Kap.6: 153 – 172.
- REHM, H. (2002b):** Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. – Spektrum, 4. Aufl., Kap.7: 173 – 213.
- REHM, H. (2002c):** Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. – Spektrum, 4. Aufl., Kap.9: 228 – 249.
- REITER, WD., HÜDEPOHL, U. & ZILLIG, W. (1990):** Mutational analysis of an archaebacterial promoter: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9509 – 9513.
- RICHARD, C. (1977)** La tétrathionate-réductase (TTR) chez les bacilles à gram négatif: intérêt diagnostique et épidémiologique. – Bull. Inst. Pasteur 75: 369 – 382.
- RITZAU, M., KELLER, M., WESSELS, P., STETTER, KO. & ZEECK, A. (1993):** New cyclic polysulfides from hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*. – Liebigs Ann. Chem. 25: 871 – 876
- ROHRINGER, R. & HOLDEN, D. (1985):** Protein blotting. detection of proteins with colloidal gold and of glycoproteins and lectins with biotin-conjugated and enzymes probes. – Analyt. Biochem. 144: 118 – 127.
- ROLIA, E. & CHAKRABATI, CL. (1982):** Kinetics of decomposition of tetrathionate, trithionate, and thiosulfate in alkaline media. – Environ. Sci. Technol. 16 (12): 852 – 857.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. – Science 239: 487 – 491.
- SAITO, Y., ISHII, Y., NIWA, M. & UEDA, I. (1987):** Production and isolation of recombinant somatomedin C. – J. Biochem. 101: 1081 – 1288.
- SALINOWICH, O. & MONTELARO, R. (1986):** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-PAGE. – Anal. Biochem. 156: 341 – 347.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. (2001):** Molecular cloning. A laboratory manual. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., 3 Bände.
- SANDERCOCK, LE., MACLEOD, AM., ONG, E., WARREN, RAJ. (1994):** Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. – FEMS Microbiol. Lett. 118: 1 – 8.
- SANGER, F., AIR, G.M., BARRELL, B.G., BROWN, N.L., COULSON, A.R., FIDDES, C.A., HUTCHISON, C.A., SLOCOMBE, P.M. & SMITH, M. (1977):** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X 174 DNA. – Nature 265: 687 – 695
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOV, G. (1987):** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. – Anal. Biochem. 199: 223 – 231.
- SCHAUDER, R. & KRÖGER, A. (1993):** Bacterial sulphur respiration. – Arch. Microbiol. 159: 491 – 497.

- SCHADEL, M. & TRÜPER, HG. (1979):** Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. – Biochim. Biophys. Acta 568: 454 – 467.
- SCHADEL, M., VANSELOW, M. & TRÜPER, HG. (1979):** Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. – Arch. Microbiol. 121: 29 – 36.
- SCHLEGEL, HG. (1991):** Allgemeine Mikrobiologie. – Thieme, Stuttgart, 7. Aufl., Kap.1: 1 – 16.
- SCHMITT, W., SCHLEIFER, G. & KNOBLOCH, K. (1981):** The enzymatic system thiosulfate: cytochrome c oxidoreductase from photolithoautotrophically grown *Chromatium vinosum*. – Arch. Microbiol. 130: 334 – 338.
- SCHÖNHEIT, P. & SCHÄFER, T. (1995):** Metabolism of hyperthermophiles. – World J. Microbiol. Biotechnol. 11:26 – 56.
- SCOPES, RK. (ed) (1994):** Protein purification. Principles and practice. 3rd. edn. Springer, NY.
- SHAHAK, Y., ARIELI, B., PADAN, E. & HAUSKA, G. (1992):** Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*. – FEBS Lett. 299: 127 – 130.
- SHIMA, S. & SUZUKI, KI. (1993):** *Hydrogenobacter acidophilus* sp. nov., a thermophilic aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium requiring elemental sulfur for growth. – Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 703 – 708.
- SHOONER, F., BOUSQUET, J. & TYAGI, RD. (1996):** Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosultatus* sp. nov. – Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 409 – 415.
- SHRIHARI, BSR., MODAK, JM., KUMAR, R. & GANDHI, KS. (1993):** Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. Biotechnol. Bioeng. 41:612 – 616.
- SLANGEN, CJ. & VISSER, S. (1999):** Use of Mass Spectrometry To Rapidly Characterize the Heterogeneity of Bovine r-Lactalbumin. – J. Agric. Food Chem. 47: 4549 – 4556.
- SLEYTR, UB., MESSNER, P., PUM, D. & SÁRA, M. (1999):** Crystalline Bacterial Cell Surface Layers (S Layers): From Supramolecular Cell Structure to Biomimetics and Nanotechnology. – Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38: 1034 – 1054.
- SLEYTR, UB., SÁRA, M., KÜPCÜ, Z. & MESSNER, P. (1986):** Structural and chemical characterization of S-layers of selected strains of *Bacillus stearothermophilus* and *Desulfotomaculum nigrificans*. – Arch. Microbiol. 146: 19 – 24.
- SOROKIN, DY., TESKE, A., ROBERTSON, LA. & KUENEN, JG (1999):** Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. – FEMS Microbiol. Ecol. 30: 113 – 123.
- SOUTHERN, EM. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. – J. Mol. Biol. 98: 503 – 517.
- STEUDEL, R. (1985):** Neue Entwicklungen in der Chemie des Schwefels und des Selen. – Nova Acta Leopoldina 264: 231 – 246.
- STEUDEL, R., HOLDT, G., GÖBEL, T. & HAZEU, W. (1987):** Chromatographic separation of higher polythionates S_nO_{62} ($n=3...22$) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: molecular composition of bacterial sulfur secretions. – Angew. Chem. Int. Edit. Engl. 26: 151 – 153.
- STEUDEL, R. (1989):** On the nature of the 'elemental sulfur' (S^0) reduced by sulfur-oxidizing bacteria – a model for S^0 globules. – In: Autotrophic Bacteria, ed. by HG. Schlegel & B. Bowien; Madison, WI: Science Technology Publishers: 289 – 303.
- STEUDEL, R. (2000):** – In *Environmental technologies to treat sulfur pollution*, pp 1-32. Edited by P Lens & L Hulshoff Pol. London: IWA Publishing
- SUGIO, T., KATAGIRI, T., INAGAKI, K. & TANO, T. (1989):** Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur: ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. – Biochim Biophys. Acta 973: 250 – 256.
- SUGIO, T., HIRAYAMA, K., INAGAKI, K., TANAKA, H. & TANO, T. (1992a):** Molybdenum oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. – Appl. Environ. Microbiol. 58: 1768 – 1771.
- SUGIO, T., HIROSE, T., LI-ZHEN, Y. & TANO, T. (1992b):** Purification and some properties of sulfite: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. – J. Bacteriol. 174: 4189 – 4192.
- SUN, CW., CHEN, ZW., HE, ZG. ZHOU, PJ. & LIU, SJ. (2003):** Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. – Extremophiles 7: 131 – 134.
- TABATABAI, MA. (1974):** Determination of sulfate in water samples. – Sulphur Institution Journal 10: 11 – 13.
- TAKAHASHI, Y. & NAKAMURA, M. (1999):** Functional assignment of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hycB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of the FeS clusters in *Escherichia coli*. – J. Biochem. 126: 917 – 926.

- Teder, A. (1971):** The equilibrium between elementary sulfur and aqueous polysulfide solutions. – *Acta Chem. Scand.* 25: 1722 – 1728.
- TEIXEIRA, M., BATISTA, R., CAMPOS, A.P., GOMES, C., MENDES, J., PACHECO, I., ANEMULLER, S. & HAGEN, W.R. (1995):** A seven-iron ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. – *Eur. J. Biochem.* 227: 322 – 327.
- THEN, J. (1984):** Beiträge zur Sulfidoxidation durch *Ectothiorhodospira abdelmalekii* und *Ectothiorhodospira halochloris*. – PhD thesis, University of Bonn.
- THOTOKURA, H. & BAHL, O. (1987):** Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. – *Method Enzymol.* 138: 350 – 359.
- THURING, R.W., SANDERS, JPM. & BORST, P. (1975):** A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. – *Anal. Biochem.* 66: 213 – 220.
- TOGHROL, F. & SOUTHERLAND, WM. (1983):** Purification of *Thiobacillus novellus* sulfite oxidase. – *J. Biol. Chem.* 258: 6762 – 6766.
- TOKUMOTO, U., NOMURA, S., MINAMI, Y., MIHARA, H., KATO, S.I., KURIHARA, T., ESAKI, N., KANAZAWA, H., MATSUBARA, H. & TAKAHASHI, Y. (2002):** Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. – *J. Biochem.* 131: 713 – 719.
- TRÜPER, HG. & FISCHER, U. (1982):** Anaerobic oxidation of sulphur compounds as electron donors for bacterial photosynthesis. – *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 298: 529 – 542.
- UMEMOTO, J., BHAVANANDAN, V. P. & DAVIDSON, E. A. (1977):** Purification and properties of an endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. – *J. Biol. Chem.* 252: 8609 – 8614.
- URICH, T. (2001):** Ein neuer Stoffwechselweg bei Archaea. Untersuchungen zur anaeroben Schwefeldisproportionierung bei *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera sp.*. – Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 87 Seiten.
- VANEECHOUTTE, M., ROSSAU, R., DE VOS, P., GILLIS, M., JANSSENS, D., PAEPE, N., DE ROUCK, A., FIERIS, T., CLAEYS, G. & KERSTERS, K. (1992):** Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). – *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 227 – 233.
- VAN HEIJNE, RA. (1990):** The signal peptide. – *J. Membr. Biol.* 115: 195 – 201.
- VEITH, A. (2006):** Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, in Arbeit.
- VOET, D. & VOET, J.G. (1994):** Biochemie. – VCH, Weinheim, 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage, Kap II: 55 – 102.
- WACKER, M., LINTON, D., HITCHEN, PG., NITLAZAR, M., HASLAM, SM., NORTH, SJ., PANICO, M., MORRIS, HR., DELL, A., WREN, BW. & AEBI, M. (2002):** N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. – *Science* 298: 1790 – 1793.
- WAHLUND, TM., WOESE, CR., CASTENHOLZ, RW. & MADIGAN, MT. (1991):** A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidarium* sp. nov. – *Arch. Microbiol.* 156: 81 – 90.
- WARDI, AH. & MICHOS, GA. (1972):** Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. – *Anal. Biochem.* 49: 607 – 609.
- WEISS, RL. (1973):** Attachment of bacteria to sulphur in extreme environments. – *J. Gen. Microbiol.* 77: 501 – 507.
- WESSEL, D. & FLÜGGE, UI. (1984):** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. – *Anal. Biochem.* 138: 141 – 143.
- WHITED, GM. & TUTTLE, JH. (1983):** Separation and distribution of thiosulfate-oxidizing enzyme, tetrathionate reductase, and thiosulfate reductase in extracts of marine heterotroph strains 16B. – *J. Bacteriol.* 156: 600 – 610.
- WIDDEL, F. (1980):** Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. – Dissertation, Universität Göttingen.
- WIEGEL, J., WILKE, D., BAUMGARTEN, J., OPITZ, R. & SCHLEGEL, HG. (1978):** Transfer of the nitrogen-fixing bacteria *Corynebacterium autotrophicus* Baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen. nov. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 573 – 581.
- WILKINS, MR., LINDSKOG, I., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, JC., HOCHSTRASSER, DF. & APPEL, RD. (1997):** Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World Wide Web accessible tool. – *Electrophoresis* 18: 403 – 408.
- WILSON, K. (1990):** Preparation of genomic DNA from bacteria, In: *Curr. Prot. Mol. Biol.*, pp. 2.4.1 – 2.4.5., Ed. Ausbel, FM., Brent, R., Kingston, RE. & et al., NY: John Wiley & Sons.
- Wittung-Stafshede, P., Gomes, CM. & Teixeira, M. (2000):** Stability and folding of the ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. – *J. Inorg. Biochem.* 78: 35 – 41.

- WODARA, C., KOSTKA, S., EGERT, M., KELLY, DP. & FRIEDRICH CG. (1994):** Identification and sequence analysis of the *soxB* gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. – J. Bacteriol. 176: 6188 – 6191.
- WOESE, CR., KANDLER, O. & WHEELIS, ML: (1990):** Towards a natural system of organism: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576 – 4579.
- WOESE, CR. (2000):** Interpreting the universal phylogenetic tree. – PNAS 97: 8392 – 8396.
- WOESE, CR. (2002):** On the evolution of cells. – PNAS 99: 8742 – 8747.
- ZILLIG, W., YEATS, S., HOLZ, I., BÖCK, A., GROPP, F., RETTENBERGER, M. & LUTZ, G. (1985):** Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. – Nature 313: 789 – 791.
- ZILLIG, W., YEATS, S., HOLZ, I., BÖCK, A., RETTENBERGER, M., GROPP, F. & SIMON, G. (1986):** *Desulfurolobus ambivalens* gen. nov., sp.nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing and reducing sulfur. – Syst. Appl. Microbiol. 8: 197 – 203.
- ZIMMERMANN, P. (1998):** Wege der Sulfitoxidation in dem Archaeon *Acidianus ambivalens*. – Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 83 Seiten.
- ZIMMERMANN, P. (2003):** Aktivierung und Reprimierung der Gasvesikelbildung in *Haloferax mediterranei*. – Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, 137 Seiten.

VIII Anhang

1 Nukleotidsequenz des contig 275 mit daraus abgeleiteter Aminosäuresequenz

ApoI BstBI PsiI
 1 TTAACGAAATTTTCAAGGAAATTTAATGAAACAGAATGGGGACATACGGTATGCTATAT 60
 AATTGCTTTAAAGCTTCCTTTAATATTACTTGTCTTACCCCTGTATGCCATACGATATA
 → start contig 275
 * R N F E G N Y N E T E W G H T V C Y M -
 GTGTGTTCCAAAATCTACATCTTGTGTTGTTCCATTTGGGGAAATAAAAGCTGCTGTAAA
 61 CACACAAGGTTTTAGATGTAGAACACAACAGGTAAACCCCTTTATTTTCGACGACATT 120
 C V P K S T S C V V P F G E I K A A V K -
 BmrI BsaXI
 121 AGTTGTAGGCTATGCAGCTTGCAGTTTCTGCCAGTAGAATATCCTTATGATCCAATAGG 180
 TCAACATCCGATACGTCGAACGCCAAAGACGGGTCATCTTATAGGAATACTAGGTTATCC
 V V G Y A A C G F C P V E Y P Y D P I G -
 BsaXI BsmBI
 181 AGTTGCAGTAGAAATAATGTGGGGAGAATCAATTTACGTCCTCTGGTATTCAAATAGCAGA 240
 TCAACGTCATCTTTATTACACCCCTCTTAGTTAAATGCAGAGACCATAAGTTTATCGTCT
 V A V E I M W G E S I Y V S G I Q I A D -
 SnaBI/BsaAI BstBI SapI/EarI ApoI
 241 CTAAATATACGTAATTTATTTCTCGTTTTTGTAGCTCTTCGAATAAGCAAAAATTTCTGTAT 300
 GATTATATGCATTTAATAAAGAGCAAAAATCGAGAAGCTTATTCGTTTTTAAGAACATA
 * I Y V N Y F S F L A L R I S K N S C I -
 TATA-Box-Motiv fürs 1.ATG
 301 AGTATAATTTTATTCATTGTTTATATACTTATCTTTAGCTAATAATTGATAAAAGACAATT 360
 TCATATTAAAATAAGTAACAAAATATGAATAGAAATCGATTATTAACTATTTTCTGTAA
 V * F Y S L F Y T Y L * L I I D K R Q L -
 BstZ17I EcoRI NcoI
 AccI TATA-Box-Motiv für's 2.ATG
 361 ATTCATTGTATACTATTGTAGTCATAAGTTTTTAATATGGAATACGATAACACTTTCAA 420
 TAAGATAACATATGATAACATCAGTATTCAAAAATTATACCTTATGCTATTGTGAAAGTT
 → 1.ATG
 F Y C I L L * S * V F N M E Y D N T F N -

EcoRI
 BstYI/BglII NcoI BstYI
 CAACGAATTCACCATGGATCTCTCGACCAAG Primer 2N für PLM TATA-Box- Motiv für's
 CAGATCTAGTATGGATCTCTCGACCAAGAAGGTAATAAGTCTAGTTTTATATA 3.ATG
 421 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 480
 GCTAGATCATACCTAGAGAGCTGGTCTTCCATTATTCACGACCAGATCAAAAATATAT
 Start sbp-RNA → Start Leader (2.ATG) hydrophober AS-Teil
 b R S S M D L S T K K V I S A G L V F I Y -
 Signalsequ.
 EcoRI PciI BsrDI EcoRI BspHI Primer4N'2 (POL) SfcI
 GTTAGAATTCGACATGTTAGTTCCAATGTTCC CCAAGAATTCCTCATGAGTAATCAAGGAGTAATAT
 CGCGTTAAGTTTGGAATGTTAGTTCCAATGTTCTTAGCAAGTAATCAAGGAGTAATATC
 481 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 540
 GCGCAATTCAAACCGTTACAATCAAGGTTACAAGAATCGTTCATTAGTTCCTCATTATAG
 → 3.ATG 4.ATG |---- > Nterm
 b A L S L A M L V P M F L A S N Q G V I S -
 PstI AseI SexAI BpmI
 TGCAGTAATTAATCCGGCAACTGGAGGAAATTGCTTACCTGGTAGATATTCTGGAATAGT
 541 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 600
 ACGTCATTAATTAGGCCGTTGACCTCCTTTAACGAATGGACCATCTATAAGACCTTATCA
 b A V I N P A T G G N C L P G R Y S G I V -
 SfcI PstI BspMI
 TCAAGCTAGTGGTGTAAACATTACCTGCAGTAAACCTATCTTACGTTGCACCTTTTACCAG
 601 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 660
 AGTTCGATCACCACATTGTAATGGACGTCATTGATAGAATGCAACGTGGAAAATGGTC
 AGTTCGATCACCACATTGTAATGGAC Primer ext.
 b Q A S G V T L P A V N L S Y V A P F T S -
 BsrDI SspI
 TGCATTGCCATTGTTAGTATATAGTCAGTCAATATTCAATGGTACGTTATATTACTATAA
 661 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 720
 ACGTAACGGTAACAATCATATATCAGTCAGTTATAAGTTACCATGCAATATAATGATATT
 b A L P L L V Y S Q S I F N G T L Y Y Y N -
 SfcI BamHI/BstYI TatI
 CTCTACAGGATCCTATGAATTGATGAAAAAATATGGAATTAGTATCACGCCAGTACATCA
 721 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 780
 GAGATGTCCTAGGATACTTAACTACTTTTTTATACCTTAATCATAGTGGGTCATGTAGT
 b S T G S Y E L M K K Y G I S I T P V H Q -
 SmlI SfcI
 AATAGTAAATGTGACCTCAAGATTCTTTGCAAGAACTACAGAAGGCGTTATTCCAAATAC
 781 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 840
 TTATCATTTTAACTGGAGTTCTAAGAAACGTTCTTGATGTCTTCCGCAATAAGGTTTATG
 b I V N V T S R F F A R T T E G V I P N T -
 MfeI BsaXI
 ATTACCACCTTATACTTCTGGCAATTGCTACTTATTTAACACAACACCTCCTACACCAT
 841 - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 900
 TAATGGTGGAATATGAAGACCGTTAACGATGAATAAATTGTGTTGTGGAGGATGTGGTAA
 b L P P Y T S G N C Y L F N T T P P T P F -

BsaXI
 CTATTATAGTTACAGAACATTAGCAATGGTAAACTCTTACTTCCCCAATACACAATATAT
 901
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GATAATATCAATGTCTTGTAATCGTTACCATTGAGAATGAAGGGGTATGTGTTATATA
 b
 Y Y S Y R T L A M V N S Y F P N T Q Y I -
 TatI
 TAATACTAGCTCAGAAATAAGCGATTGTACTTTAATGTATCTTACTTACCTTATAATAC
 961
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 ATTATGATCGAGTCTTTATTTCGCTAAACATGAAATTACATAGAATGAATGGAATATTATG
 b
 N T S S E I S D L Y F N V S Y L P Y N T -
 BpmI
 TACATTAACATTATCTATATATGCAACTCCAGCATTACAAGGAATAGAAGGCATTATAAG
 1021
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 ATGTAATTGTAATAGATATATACGTTGAGGTCGTAATGTCTCTTATCTTCCGTAATATTC
 b
 T L T L S I Y A T P A L Q G I E G I I R -
 NdeI
 ATTCAACTTTAGCGTTAAGTTATGTGCTAATAGCACAAATATATCCATATGCTGAATACAC
 1081
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 TAAGTTGAAATCGCAATTCAATACACGATTATCGTGTTATATAGGTATACGACTTATGTG
 b
 F N F S V K L C A N S T I Y P Y A E Y T -
 SpeI
 TCTACACGCATATTTCTATTTCATAAATCATTATCTGTGAATTAGAGAACATAAAGAC
 1141
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 AGATGTGCGTATAAAGATAAAGTTATTGAGTAAGTAGACACTTAATCTCTTGTATTCTG
 b
 L H A Y F Y F N N S F I C E L E N I K T -
 AccI BstZ17I
 TAGTATACCCGGTGTAGCATCTGCAACATCTCCTACGACAATACACTTCACATCTACTGC
 1201
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 ATCATATGGGCCACATCGTAGACGTTGTAGAGGATGCTGTTATGTGAAGTGTAGATGACG
 b
 S I P G V A S A T S P T T I H F T S T A -
 PstI BstYI/BglII AclI TatI
 AGTAAATTACATATTATTAGTAGATCTAGGTCTATGGAGTAACGTTAGTACAGTATATGT
 1261
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TCATTTAATGTATAATAATCATCTAGATCCAGATACCTCATTGCAATCATGTCATATACA
 b
 V N Y I L L V D L G L W S N V S T V Y V -
 PstI BstYI/BglII AclI TatI
 AGTAAATTACATATTATTAGTAGATCTAGGTCTATGGAGTAACGTTAGTACAGTATATGT
 1261
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TCATTTAATGTATAATAATCATCTAGATCCAGATACCTCATTGCAATCATGTCATATACA
 b
 V N Y I L L V D L G L W S N V S T V Y V -
 BcgI
 AACAGGCGTTGAAGGTGCAACCTATCCATCCGATACAGTTGCAACTACTATAAACAATGG
 1321
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 TTGTCCGCAACTTCCACGTTGGATAGGTAGGCTATGTCAACGTTGATGATATTTGTTACC
 b
 T G V E G A T Y P S D T V A T T I N N G -

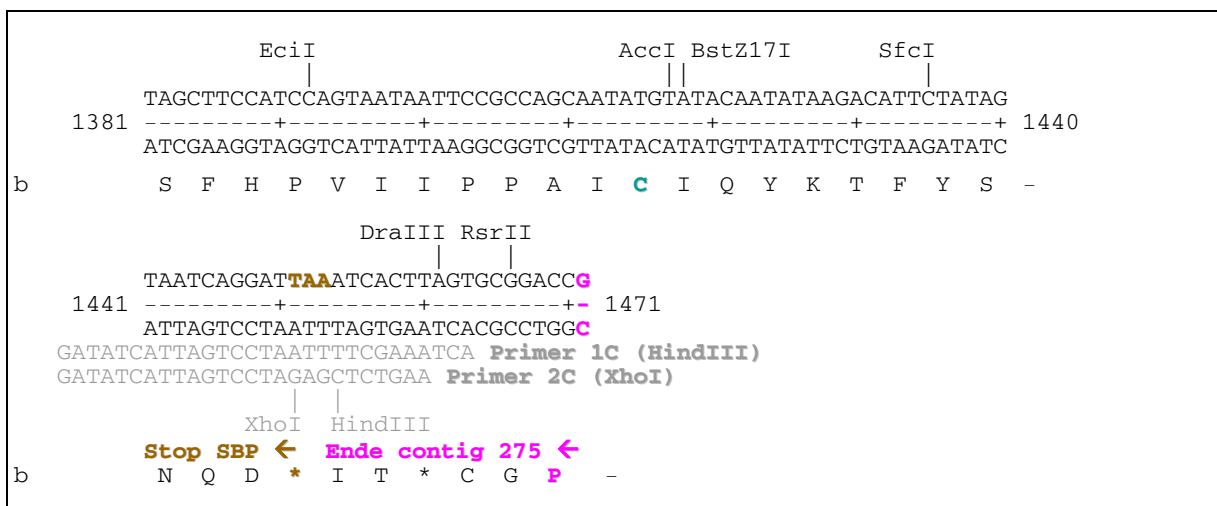


Abbildung 78: Nukleotidsequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des contig 275.

rosa = Start, bzw. Stop des contig 275; grau = verwendete Primer; **braun** = Stop des SBP; **A** = Start der *sbp*-RNA, festgestellt durch Primer-Extension; **KK** = Signal für eine Leitsequenz; **lila** = hydrophober Aminosäureanteil in der Signalsequenz; **türkis** = Cysteine im SBP, **→ Orange** = Start der Signalsequenz bzw. des SBP; **dunkelgrün** = TATA-Box-Motiv; **SpeI** = Enzym für den Southern

2 Find Pept (Expasy)

Die Toleranz bei den Find Pept-Analysen betrug $\pm 0,5$ Da, als Enzym für den hypothetischen Verdau des SBP wurde Trypsin (P00761) verwendet.

2.1 SBP gegen MALDI-TOF-Analyse Nr.7

Eingegebene Peptidmassen (MALDI-TOF Nr.7): 2618,272 2707,246 2720,191 2748,260

Tabelle 19: Peptide resultierend aus dem hypothetischen Proteaseverdau des SBP mit Trypsin und Vergleich mit den durch MALDI-TOF-Analyse Nr.7 erhaltenen Peptidfragmenten.

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehlertreffer
2707.246	2707.416	0.170	(R)/IQVRLGEHNIDVLGNEQFI NAAK/(I)	54-77	1

Tabelle 20: Passende Peptide bei unspezifischen hypothetischen Verdau des SBP und Vergleich mit den durch MALDI-TOF-Analyse Nr.7 erhaltenen Peptidfragmenten (s.o.).

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehlertreffer
2618,272	2618,281	0,008	(F)YFNNSFICELENIKTSIPGV ASAT(S)	213-236	0
2720,191	2720,252	0,061	(S)GNCYLFNTTPPTPFYYSYRT LAM(V)	114-136	0
	2720,266	0,075	(Y)YSYRTLAMVNSYFPNTQYIN TSS(E)	129-151	0
	2720,491	0,299	(S)GVTLPAVNLSYVAPFTSALP LLVYSQ(S)	31-56	0
2748,260	2748,406	0,146	(G)IEGIIRFNFSVKLCANSTIY PYAE(Y)	182-205	1
	2748,445	0,185	(P)GVASATSPTTIHFTSTAVNY ILLVDLG(L)	231-257	0

2.2 SBP gegen MALDI-TOF-Analyse Nr.8

Eingegebene Peptidmassen (MALDI-TOF Nr.8): 741,272 769,292 773,441 782,482 786,318 828,487 838,513 848,264 850,538 861,283 863,266 868,537 882,569 905,478 912,421 996,614 1051,728 1152,686 1165,745 1178,594 1236,657 1254,676 1262,716 1279,733 1288,661 1302,680 1326,740 1335,809 1384,701 1400,712 1412,710 1428,671 1448,829 1475,792 1511,870 1552,746 1576,069 1577,846 1635,759 1675,838 1677,930 1714,843 1753,847 1758,987 1779,763 1784,751 1791,786 2024,127 2398,997 2706,046

Tabelle 21: Peptide resultierend aus dem hypothetischen Proteaseverdau des SBP mit Trypsin und Vergleich mit den durch MALDI-TOF-Analyse Nr.8 erhaltenen Peptidfragmenten.

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehlertreffer
741,272	741,393	0,120	(R)/FNFSVK(L)	188-193	0

Tabelle 22: Passende Peptide bei unspezifischen hypothetischen Verdau des SBP und Vergleich mit den durch MALDI-TOF-Analyse Nr.8 erhaltenen Peptidfragmenten (s.o.).

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehlertreffer
769,292	769,352	0,059	(S)YFPNTQ(Y)	140-145	0
	769,352	0,059	(Y)FPNTQY(I)	141-146	0
	769,373	0,080	(W)SNVSTVY(V)	260-266	0
	769,399	0,107	(I)RFNFSV(K)	187-192	0
773,441	773,310	-0,130	(T)FYSNQD	305-310	0
	773,329	-0,112	(G)NCYLFN(T)	115-120	0
	773,372	-0,068	(T)GGNCLPGR(Y)	15-22	0
	782,357	-0,125	(A)TYPSTV(A)	274-280	0
782,482	782,357	-0,125	(A)TYPSTV(A)	274-280	0
786,318	786,399	0,081	(I)PGVASATSP(T)	230-238	0
	786,472	0,153	(N)QGVISAVI(N)	3-10	0
828,487	828,446	-0,040	(A)TPALQGIE(G)	176-183	0
838,513	838,340	-0,173	(L)PPYTSNGC(Y)	109-116	0
	838,449	-0,063	(P)AICIYK(T)	297-303	0
848,264	848,415	0,150	(T)LPPYTSNG(C)	108-115	0
	848,418	0,154	(I)CELENIK(T)	220-226	0
	848,436	0,171	(V)ASATSP(T)(H)	233-241	0
	848,462	0,198	(L)PGRYSGIV(Q)	20-27	0
	848,462	0,198	(I)EGIIIRFN(F)	183-189	0
	848,513	0,248	(N)YILLVDL(G)	250-256	0
850,538	850,415	-0,122	(Y)INTSSEIS(D)	147-154	0
	850,503	-0,034	(G)VIPNTLPP(Y)	103-110	0
861,283	861,381	0,098	(N)CYLFNTT(P)	116-122	0
861,283	861,508	0,224	(P)FTSALPLL(V)	45-52	0
863,266	863,426	0,159	(L)GLWSNVST(V)	257-264	0
868,537	868,387	-0,150	(L)CANSTIYP(Y)	195-202	0
	868,441	-0,095	(F)TSTAVNYI(L)	244-251	0
	868,441	-0,095	(W)SNVSTVYV(T)	260-267	0
	868,460	-0,077	(Y)ELMKKYG(I)	73-79	1
	868,460	-0,077	(A)ICIQYK(T)	298-304	0
882,569	882,436	-0,133	(Y)FPNTQYI(N)	141-147	0
	882,457	-0,112	(S)NVSTVYVT(G)	261-268	0
	882,483	-0,085	(I)IRFNFSV(K)	186-192	0
905,478	905,440	-0,037	(D)LYFNVS(Y)	156-162	0
	905,440	-0,037	(L)YFNVSYL(P)	157-163	0
	905,473	-0,005	(G)LWSNVSTV(Y)	258-265	0
	905,520	0,042	(T)PVHQIVNV(T)	84-91	0
	905,534	0,056	(N)YILLVDLG(L)	250-257	0
912,421	912,467	0,046	(P)YNTTTL(I)	165-172	0
996,614	996,479	-0,135	(Y)FPNTQYIN(T)	141-148	0
	996,547	-0,066	(P)VHQIVNVT(S)	85-93	0
1051,728	1051,488	-0,239	(Y)FYFNNSFI(C)	212-219	0
1152,686	1152,539	-0,146	(I)CIQYKTFYS(N)	299-307	0
	1152,568	-0,117	(I)HFTSTAVNYI(L)	242-251	0
	1152,568	-0,117	(T)IHFTSTAVNY(I)	241-250	0
	1152,594	-0,092	(L)SYVAPFTSALP(L)	40-50	0
	1152,648	-0,037	(P)VHQIVNVT(S)(F)	85-94	0
1165,745	1165,516	-0,228	(Q)YKTFYSNQD	302-310	1
	1165,556	-0,188	(L)YFNVSYP(N)	157-165	0
	1165,636	-0,108	(Q)GIEGIIRFN(S)	181-190	0
1178,594	1178,548	-0,046	(I)QYKTFYSNQ(D)	301-309	0

Fortsetzung Tabelle 22:

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehlertreffer
1178,594	1178,591	-0,002	(A)ICIQYKTFY(S)	298-306	0
	1178,599	0,004	(G)NCLPGRYSGIV(Q)	17-27	0
	1178,646	0,051	(S)YVAPFTSALPL(L)	41-51	0
1236,657	1236,702	0,045	(L)MKKYGISITPV(H)	75-85	1
	1236,746	0,089	(G)IIRFNFSVKL(C)	185-194	1
1254,676	1254,621	-0,054	(W)SNVSTVYVTGVE(G)	260-271	0
1262,716	1262,663	-0,053	(L)SIYATPALQGIE(G)	172-183	0
	1262,666	-0,049	(F)ICELENIKTSI(P)	219-229	0
1279,733	1279,599	-0,133	(L)YFNVSYPYN(T)	157-166	0
	1279,730	-0,003	(A)LPLLVYSQSIF(N)	49-59	0
1288,661	1288,653	-0,007	(P)GVASATSPTTIHF(T)	231-243	0
	1288,653	-0,007	(S)PTTIHFTSTAVN(Y)	238-249	0
	1288,661	0,000	(T)GSYELMKKYGI(S)	70-80	1
1302,680	1302,767	0,086	(T)AVNYILLVDLGL(W)	247-258	0
1326,740	1326,617	-0,122	(P)SDTVATTINNGSF(H)	277-289	0
	1326,742	0,001	(K)/YGISITPVHQIV(N)	78-89	0
	1326,749	0,008	(H)PVIIPPAICIQY(K)	291-302	0
1384,701	1384,657	-0,044	(T)LAMVNSYFPNTQ(Y)	134-145	0
	1384,736	0,034	(N)VSYPYNTTLTL(S)	160-171	0
1400,712	1400,633	-0,079	(Y)FPNTQYINTSSE(I)	141-152	0
	1400,655	-0,056	(N)CYLFNTTPPTPF(Y)	116-127	0
	1400,778	0,066	(S)GVTLPAVNLSYVAP(F)	31-44	0
1412,710	1412,699	-0,010	(Y)RTLAMVNSYFPN(T)	132-143	0
	1412,753	0,043	(A)TTINNGSFHPVII(P)	282-294	0
	1412,774	0,064	(Y)SGIVQASGVTLPAVN(L)	24-38	0
1428,671	1428,723	0,051	(V)NVTSRFFARTTE(G)	90-101	1
	1428,751	0,080	(G)VISAVINPATGGNCL(P)	5-19	0
	1428,810	0,138	(Y)ILLVDLGLWSNVS(T)	251-263	0
1448,829	1448,799	-0,029	(T)TLTSLIYATPALQG(I)	168-181	0
1475,792	1475,688	-0,104	(N)TLPPYTSGNCYLF(N)	107-119	0
	1475,720	-0,072	(G)VIPNTLPPYTSGN(C)	103-116	0
	1475,800	0,008	(T)INNGSFHPVIIPPA(I)	284-297	0
	1475,800	0,008	(I)NNGSFHPVIIPPAI(C)	285-298	0
1511,870	1511,683	-0,186	(T)SGNCYLFNTTPPT(F)	113-126	0
	1511,781	-0,088	(S)NQGVISAVINPATGGN(C)	2-17	0
	1511,833	-0,037	(Q)IVNVTSRFFARTT(E)	88-100	1
1576,069	1575,717	-0,351	(I)NTSSEISDLYFNVS(Y)	148-161	0
	1575,762	-0,306	(S)YRTLAMVNSYFPN(T)	131-143	0
	1575,784	-0,284	(T)PPTPFYYSYRTLA(M)	123-135	0
	1575,838	-0,231	(R)/YSGIVQASGVTLPAVN(L)	23-38	0
	1575,849	-0,220	(P)GRYSGIVQASGVTLPA(V)	21-36	0
	1575,878	-0,190	(T)AVNYILLVDLGLWS(N)	247-260	0
1577,846	1577,694	-0,151	(L)PPYTSGNCYLFNTT(P)	109-122	0
	1577,694	-0,151	(P)PYTSGNCYLFNTTP(P)	110-123	0
	1577,694	-0,151	(P)YTSGNCYLFNTTP(T)	111-124	0
	1577,781	-0,065	(P)GVASATSPTTIHFTST(A)	231-246	0
	1577,851	0,004	(N)NGSFHPVIIPPAICI(Q)	286-300	0
1635,759	1635,729	-0,030	(V)NSYFPNTQYINTSS(E)	138-151	0
	1635,772	0,013	(V)KLCANSTIYPYAEY(T)	193-206	0
	1635,791	0,031	(T)GGNCLPGRYSGIVQASG(V)	15-31	0
	1635,899	0,140	(A)PFTSALPLLVSQSI(F)	44-58	0
1675,838	1675,815	-0,023	(P)PAICIQYKTFYSNQ(D)	296-309	0
	1675,822	-0,015	(A)VINPATGGNCLPGRYSG(I)	9-25	0
	1675,822	-0,015	(I)NPATGGNCLPGRYSGIV(Q)	11-27	0
	1675,903	0,064	(V)HQIVNVTSRFFART(T)	86-99	1
	1675,917	0,078	(A)TPALQGIEIIRFNF(S)	176-190	0
1677,930	1677,762	-0,168	(G)NCYLFNTTPPTPFY(Y)	115-128	0
	1677,815	-0,114	(Y)NSTGSYELMKKYGIS(I)	67-81	1
	1677,838	-0,092	(G)GNCLPGRYSGIVQASGV(T)	16-32	0
	1677,885	-0,045	(S)PTTIHFTSTAVNYIL(L)	238-252	0
	1677,896	-0,034	(V)ATTINNGSFHPVIIP(A)	281-296	0
	1677,896	-0,034	(A)TTINNGSFHPVIIP(A)	282-297	0
1714,843	1714,905	0,062	(L)PLLVYSQSIFNGTLY(Y)	50-64	0
	1714,949	0,105	(C)LPGRYSGIVQASGVTLPA(A)	19-35	0
	1753,822	-0,024	(L)FNTTPPTPFYYSYR(T)	119-132	0
	1753,847	0,000	(Y)NSTGSYELMKKYGI(S)	66-80	1
	1753,977	0,130	(N)LSYVAPFTSALPLLVS(S)	39-54	0
1758,987	1758,818	-0,168	(G)ATYPSDTVATTINNGSF(H)	273-289	0
	1758,837	-0,150	(Y)FNNSFICELENIKTS(I)	214-228	0
	1758,843	-0,143	(S)TVYVTGVEGATYPSDTV(A)	264-280	0

Fortsetzung Tabelle 22:

Masse	DB Masse	Δ Masse [Da]	Peptid	pos. modif.	Fehltreffer
1791,786	1791,826	0,039	(N)TLPPYTSGNCYLFNTT(P)	107-122	0
	1791,974	0,187	(N)TTLTSLIYATPALQGIE(G)	167-183	0
	1791,989	0,203	(N)YILLVDLGLWSNVSTV(Y)	250-265	0
	1791,989	0,203	(Y)ILLVDLGLWSNVSTV(Y)	251-266	0
	1792,012	0,225	(P)ALQEGIEGIRFNFVSK(L)	178-193	1
2024,127	2023,944	-0,183	(C)ANSTIYPYAEYTLHAYF(Y)	196-212	0
	2024,033	-0,093	(A)SATSPPTIHFTSTAVNYIL(L)	234-252	0
	2024,049	-0,078	(R)/FFARTTEGVIPNTLPPYT(S)	95-112	0
	2024,052	-0,074	(S)TGSYELMKKYGISITPVH(Q)	69-86	0
	2024,066	-0,061	(L)ENIKTSIPGVASATSPPTIH(F)	223-242	1
2706,046	2706,254	0,208	(Y)TSGNCYLFNTTPTPFYYSY RTL(A)	112-134	0

Nicht gefundene Massen: 1335,809 1552,746 1779,763 1784,751

3 Glyco Mod (Expasy)

Die Bedingungen für die Berechnung von Glykosylierungsstellen im SBP beinhaltete, dass die maximale Nummer der Fehlsplaltungen null ist, alle Cysteine in reduzierter Form vorliegen, die Methionine nicht oxidiert sind und alle Massen monoisotopisch.

3.1 N-glykosidische Regionen im SBP

Tabelle 23: Mögliche N-glykosidisch gebundene Zuckerstruktur im Peptid.

Pent = Pentose, Hex = Hexose (z.B. Mannose, Galactose), HexNAc = N-Acetyl-Glucosamin oder N-Acetyl-Galactosamin.

Nr.	Masse der Glykoform	Struktur	Peptide-Masse (M)	Peptid-Sequenz	Theoretische Glykopeptidmasse
A	497,175	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Pent) ₁	740,386	188 – 193 FNFSVK	1238,568
B	527,185	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁	740,386	188 – 193 FNFSVK	1268,578

SNQGVISAVI	NPATGGNCLP	GRYSGIVQAS	GVTLPAV NLS	YVAPFTSALP	LLVYSQSIF N
GT LYYY NSTG	SYELMKKYGI	SITPVHQIV N	VT SRFFARTT	EGVIPNTLPP	YTSGNCYLF N
TT PPTPFYYS	YRTLAMVNSY	FPNTQYI NTS	SEISDLYF NV	SY LPY NTT LT	LSIYATPALQ
GIEGIIRF NF	SV KLCAN STI	YPYAEYTLHA	YFYF NNS FIC	ELENIKTSIP	GVASATSPPT
IHFTSTAVNY	ILLVDLGLWS	NV STVYVTGV	EGATYPSDTV	ATTIN NGS FH	PVIIPPAICI
QYKTFYSNQD					

Abbildung 79: SBP-Sequenz mit consensus-Sequenz für mögliche N-Glykosylierungsstellen.

rot = consensus-Sequenzen ohne Glykosylierungsfunktion, blau = consensus-Sequenz mit möglicher N-Glykosylierungsfunktion.

3.2 O-Glykosidische Regionen im SBP

Tabelle 24: Mögliche O-glykosidisch gebundene Zuckerstruktur im Peptid.

Pent = Pentose, Hex = Hexose (z.B. Mannose, Galactose), HexNAc = N-Acetyl-Glucosamin oder N-Acetyl-Galactosamin, Phos = Phosphate, HexA = Glucuronsäure, NeuAc = Sialinsäure.

Nr.	Masse der Glykoform	Struktur	Peptide-Masse (M)	Peptid-Sequenz	Theoretische Glykopeptidmasse
A	410,143	(Deoxyhexose) ₁ (Pent) ₂	740,386	188 – 193 FNF S VK	1151,536
B	497,175	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Pent) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1238,568
C	527,185	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1268,578
D ₁	751,184	(HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₂ (Phos) ₁ (HexA) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1492,577
D ₂	751,184	(HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₂ (Phos) ₁ (HexA) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1492,587
D ₃	618,201	(Hex) ₃ (Pent) ₁	873,350	304 – 310 TFY S NQD	1492,559
E ₁	1199,371	(Deoxyhexose) ₁ (NeuGc) ₃ (Pent) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,764
E ₂	1199,371	(Hex) ₁ (NeuAc) ₁ (NeuGc) ₂ (Pent) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,764
E ₃	1199,371	(HexNAc) ₁ (NeuGc) ₂ (Pent) ₁ (KDN) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,764
E ₄	1199,374	(HexNAc) ₄ (NeuGc) ₁ (Phos) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,767
E ₅	1199,396	(Deoxyhexose) ₄ (NeuGc) ₁ (Pent) ₁ (HexA) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,789
E ₆	1199,396	(HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₃ (Pent) ₁ (HexA) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,789
E ₇	1199,371	(HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₃ (Pent) ₁ (KDN) ₁ (HexA) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,789
E ₈	1199,408	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (NeuGc) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,801
E ₉	1199,433	(Hex) ₁ (Deoxyhexose) ₅ (NeuGc) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,826
E ₁₀	1199,433	(Hex) ₂ (Deoxyhexose) ₄ (NeuAc) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,826
E ₁₁	1199,433	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₄ (KDN) ₁	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,826
E ₁₂	1199,433	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₄ (Pent) ₃	740,386	188 – 193 FNF S VK	1940,826

SNQGVISAVI NPATGGNCLP GRYSGIVQAS GVTLPAVNL**S** YVAPF**TS**ALP LLVY**SQ**SIFN
 GTLYYYN**STG** SYELMKKYGI **S**ITPVHQIVN **VTS**RFFAR**TT** EGVIPNTLPP Y**TS**GNCYLFN
TTPP**TF**FY**S** YR**TL**AMVNSY **FP**NTQYINT**S** **SE**ISDLYFNV **SY**LPYNT**TLT** L**SI**YAT**TP**ALQ
 GIEGIIRFNF **SV**KLCAN**STI** YPYAEY**TL**HA YFYFNN**SF**IC ELENIK**TS**IP GVA**SAT**S**PTT**
 IHF**TST**AVNY ILLVDLGLW**S** NV**ST**VYV**TG**V EGATYP**SD**TV AT**TI**NN**GS**FH PVIIPPAICI
 QYK**TFY****S**NQD

Abbildung 80: SBP-Sequenz mit möglichen O-Glykosylierungsstellen,
 rot = S oder T ohne Glykosylierungsfunktion, blau = S mit möglicher N-Glykosylierungsfunktion.

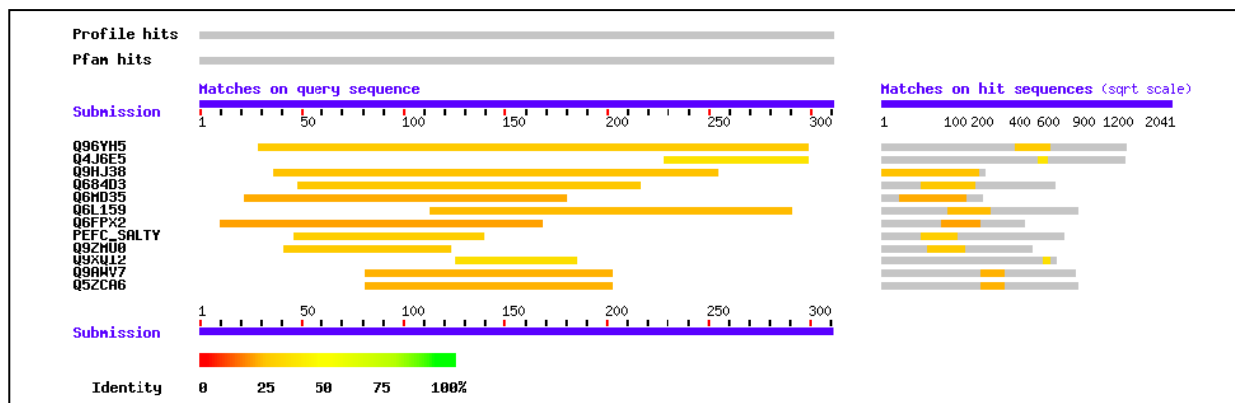
4 Blast (Expaty) und GCG-Peptide-Sort (Accelys)

ST2195	309:QLAQIAA	330	340	350	360	370	380	390	400	
SACI2319	308:QLAWIAS	330	340	350	360	370	380	390	400	388
SSO0389	138:AYSIEQS	330	340	350	360	370	380	390	400	204
CONTIGS275	1:	330	340	350	360	370	380	390	400	23
consensus	321:-----*	330	340	350	360	370	380	390	400	400
ST2195	389:TNNGSK	410	420	430	440	450	460	470	480	
SACI2319	381:.....VEYVTKLVVE	410	420	430	440	450	460	470	480	465
SSO0389	205:TYIIAIVSPTVKLVGEL	410	420	430	440	450	460	470	480	448
CONTIGS275	24:VFIIAIVS.LAMLVPMF	410	420	430	440	450	460	470	480	283
consensus	401:-----*	410	420	430	440	450	460	470	480	102
ST2195	466:TVVPVVA	490	500	510	520	530	540	550	560	
SACI2319	449:TTNNVVSQI	490	500	510	520	530	540	550	560	538
SSO0389	284:TYTNGASTPTASFQAPP	490	500	510	520	530	540	550	560	522
CONTIGS275	103:TYTYVNS	490	500	510	520	530	540	550	560	358
consensus	481:-----*	490	500	510	520	530	540	550	560	178
ST2195	538:NNVKLP	570	580	590	600	610	620	630	640	
SACI2319	522:FNIP	570	580	590	600	610	620	630	640	609
SSO0389	359:PGNYTF	570	580	590	600	610	620	630	640	586
CONTIGS275	179:NSYFPN	570	580	590	600	610	620	630	640	431
consensus	561:-----*	570	580	590	600	610	620	630	640	258
ST2195	610:YSEPS	650	660	670	680	690	700	710	720	
SACI2319	587:TA.PEGLTLLAP	650	660	670	680	690	700	710	720	687
SSO0389	432:STNTGSPQV	650	660	670	680	690	700	710	720	663
CONTIGS275	259:FC	650	660	670	680	690	700	710	720	511
consensus	641:-----*	650	660	670	680	690	700	710	720	332
ST2195	688:QMTTF	730	740	750	760	770	780	790	800	
SACI2319	664:STAPYNY	730	740	750	760	770	780	790	800	766
SSO0389	512:TTGTGS	730	740	750	760	770	780	790	800	741
CONTIGS275	333:VTPPA	730	740	750	760	770	780	790	800	582
consensus	721:-----*	730	740	750	760	770	780	790	800	351

Abbildung 81: Alignment der SBP-Sequenz gegen Proteine verschiedener *Sulfolobus*-Arten mit dem Programm GCG-Peptide-Sort (Accelys),
 ST = *Sulfolobus tokodai*, SACI = *Sulfolobus solfataricus*, SSO = *Sulfolobus solfataricus*,
 Contigs275 = SBP-Sequenz von *Acidianus ambivalens*; schwarz = identische Aminosäuren,
 grau = ähnliche Aminosäuren.

Tabelle 25 Vergleich der SBP-Sequenz gegen die Datenbank Sequenzen (Blast, Expaty),
 * siehe auch Alignment; AS = Aminosäuren,

Name	Beschreibung	Organismus	Länge (AS)	E-Wert
Q96YH5*	Hypothetisches Protein ST2195	<i>Sulfolobus tokodai</i>	1442	3e-08
Q4J6E5*	Konserviertes Protein Saci2355	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1424	8e-05
Q9HJ38	Hypothetisches Protein Ta1135	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	257	0,010
Q684D3	Hypothetisches Protein	<i>Sulfolobus tengchongensis</i> spindle-shaped virus STSV1	731	0,31
Q6MD35	Hypothetisches Protein pc0790	<i>Parachlamydia sp., subsp., Acanthamoeba sp., [Stamm UWE25]</i>	254	0,53
Q6L159	Oligopeptid ABC Transporter Dpp1, extrazelluläres Bindeprotein	<i>Picrophilus torridus</i>	930	0,70
Q6FPX2	Ähnlich zu spl P53214 von YGR023w MTL1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	497	0,91
P37868	Äußerer Membran-„usher“-Protein-Vorläufer	<i>Salmonella typhimurium</i>	802	1,6
Q9ZMU0	L-Lactat-Permease	<i>Helicobacter pylori</i> J99	549	3,5
Q9XQI2	Putative NADH-Dehydrogenase (Fragment) ndhF	<i>Levenhookia pauciflora</i>	746	3,5
Q9AWV7	Putative Serin/Threonin-spezifische Rezeptor-Protein-Kinase	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-Gruppe)	906	3,5
Q5ZCA6	Putative Licht-gehemmte Rezeptor-Protein-Kinase	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-Gruppe)	930	3,5



Abbildungung 82: Graphische Übersicht des Sequenzvergleiches (Blast, Expasy). Die Übereinstimmung der Sequenzen ist farblich codiert. Rechts ist die Lage des verglichenen Sequenzteiles im Gesamtprotein angezeigt.

SBP:	30	SGVTLPVNLSTVAPFTSALPLVMSQSIENGLTYYNSTGSEYELMKKYGISITPVHCIV	89
Q96YH5:	427	SNYTLVPVY--VMSAPAGSTISITCY----FNGTKYIVNIV-----VGSSPTLVPIYA	472
SBP:	90	NVTSRFFARTTEGVIPNTLPPVTSNGCYLFNTPPTPFYYSYRTLAMVNSYFPNTQYINT	149
Q96YH5:	473	--TTLVATAYEGIKATVSGFYTTSPIM---STPPTQIAISGOTQFQAQAQFTSSQATAT	527
SBP:	150	SSEISD--LYFNVSYPYNTTLTSLIYATPALQIEGIIIRFN-----SVKLCA	196
Q96YH5:	528	VLLTNATLQFNVVKLPGEFS--GIVVTPEYPIINGTIAMQYMSTAQYFMTNGEYELAI	585
SBP:	197	NSTIYPYAEYTHAYFYFNNSFTCELENIKT-----SIPGVASATSPTTIHF--TST	246
Q96YH5:	586	LGSELPMA---ISQYMGLQNFVISEPQYLSPEFSLTLTVPTVPATEIGTGPLFVAESTIP	642
SBP:	247	AVNYILLVDLGLWSNVSTVYVTGVEGATYPSDTVATTINNGSFEPVLIIPPAI	298
Q96YH5:	643	QYTYITLVDFGLWSNETSVVVT-----AYSTRGGITTVNHGYFYATIIPPQI	689

Abbildungung 83: Alignment von SBP gegen Q96YH5 (Blast, Expasy), Q96YH5 = Hypothetisches Protein ST 2195 von *Sulfolobus tokodai* mit 1442 Aminosäuren, Identität = 81/292 (27%; schwarz), Ähnliche = 113/292 (37%; grau), Lücken = 52/292 (17%),

SBP:	228	SIPGVASATSPTTIHF--TSTAVNYILLVDLGLWSNVSTVYVTGVEGATYPSDTVATTINN	286
Q4J6E5:	599	SVPATETGTSPLOLEFFTVPSTSYIALVDFGLWGNLTSVTV-----SAYDTVNNKLSVNL	653
SBP:	287	GSFHPVIIPPAI	298
Q4J6E5:	654	GYFYGIVIPPSI	665

Abbildungung 84: Alignment von SBP gegen Q4J6E5 (Blast, Expasy), Q4J6E5 = Konserviertes Protein Saci_2355 von *Sulfolobus acidocaldarius* mit 1424 Aminosäuren, Identität = 26/72 (36%; schwarz), Ähnliche = 42/72 (58%; grau), Lücken = 6/72 (8%),

5 Vergleich der Signalsequenzen von SBP und SSO

Tabelle 26: Vergleich der Signalsequenz des SBP (PLM) mit den Signalsequenzen von *Sulfolobus solfataricus* (SSO; Albers & Driessen, 2002).

Typen: A = Sekretorisches Signalpeptid, B = Twin-Arginine Signalpeptid, C = Lipoprotein Signalpeptid, D = Typ IV Pilin-Signalpeptid,

BP = Bindeprotein, **schwarz** = Signal-Aminosäure(n), **grau** = hydrophober Aminosäure-Anteil, unterstrichen = Vorhersage einer potentiellen Spaltstelle für die Signalsequenz, **grün** = twin-arginine Motiv, **blau** = Start des SBP, **orange** = Lipobox.

Leader	Sequenz	Funktion	Typ
PLM	MDLSTKKVISAGLVFIYALSLAMLVPMFLASNQGVISAVINPATGGNCL	SBP-PLM	?
SSO0390	MVVKKTFVLSTLILISVVALVSTAVYTSGNVTFYSPSVNNQIYYVGKSV	hypothetisch	A
SSO2669	MRKELVLEVGVIFFSISVMLFSISGLMIANSASSPFPSTLYLGWYNSNVE	Cellobiose-BP	
SSO3043	MKRYKIISTITITVLMVISIGIFAMPILSQSTSVQPEGSMVIMPSPGIVW	Oligopeptid-BP	
SSO3053	MNKKIKNVIGLTALILMALSAFMPFISSRVVNSQSPQLNPAASYSFPW	Maltose-BP	
SSO1580	MNYDSNIMVENKGLRLNRRDFLKASAAAGLVMLGYFASKYNFNIFVTR	Oxidoreduktase	B
SSO2971	MMNRRFTFLRLYLVGAAVAIAPLIKPLADYVGIFYNEIGTMSKQYLVAN	Quinol-Oxidase	
SSO2975	MLKLSRRDFLKISGATAVATAFILGGNSVAKRIFDSVSETNYTLNYPST	Oxidoreduktase	
SSO1172	MIKIAILAMGNLPKTAKAFLTLFFLLRLTSCSFLIPTSQSISVNFTVSS	hypothetisch	C
SSO1375	MSYRLLSIIIVILVMISSFQILKIIISNAEITINNNITDSNNIYMAPN	hypothetisch	
SSO0999	MSRSDKFSNKEKMRRLSTTTIIGIVVAIVIIIGVAVAAVTLLSHKPSQ	treS	D
SSO2323	MNSKKMLKEYNKKVKKGLAGLDTAIIILAFIITASVLAIVAINMGLFV	flaB	
SSO2847	MKRKYYPYSLAKGLTTSTQIAVIVAVIVIVIIIGVVAGFVLTGKPSTTAV	glcS	
SSO2146	MDMASRRKNARGLLSGAVTALILVIASVIAALVVVGFAFGLFGAFTGQG	hypothetisch	
SSO0489	MKGESTLAVVILIIVVIAVAGIFFVINSGGHNTTTTSTSSSFS	putatives Phosphat-BP	
SSO2681	MOKYRKGLLENALVTVLLILVAIAAVSLISYYFGVLRHSMITGLSISN	hypothetisch	
SSO3066	MSRRRLYKAISRTAIIIIIVVVIIIAAIAGGLAAYSSSKPPATSTSLTS	araS	
SSO1171	MGRKCKKIDYKAISKTLVAVIIIVVIVIAIGGVYAFISSQHSPAAPSST	sugar1	
SSO2846	MEGKYKRAISTSAIIIIAVVVIILIVGVVAYEQMGSHAPTSSSSMTS	hypothetisch	
SSO2712	MKALSTLAMAVIIIVVIAVVAAAAYLITSSSHHPSISTTTTPIIA	sugar2	

Sulfur Mobilization by *Acidianus ambivalens*

Acidianus ambivalens is a hyperthermophilic Crenarchaeon from the order Sulfolobales, which can oxidize sulfur aerobically. The sulfur-oxidizing enzyme is localized in the cytoplasm. Thus sulfur must be activated outside of the cell and transported inside. This sulfur mobilization was analyzed in this work. Growth with the alternative substrates tetrathionate and thiosulfate was analyzed, which could be important intermediates of sulfur mobilization. The cells did not grow with thiosulfate but with tetrathionate. A high concentration of trithionate accumulated transiently during growth with tetrathionate but not with sulfur. Sulfur precipitated during growth, which was more hydrophilic in appearance than elemental sulfur. Tetrathionate was preferred in cultures with mixed substrates. Tetrathionate-adapted cells did not grow well with sulfur. It was concluded that tetrathionate was not an intermediate of the aerobic sulfur oxidation pathway.

Culture supernatants and spent sulfur pellets were analyzed for the presence of proteins. A single protein termed sulfur-binding protein (SBP) was isolated from the sulfur pellets of cultures grown aerobically. The SBP was highly glycosylated. It had a brown color in solution, which correlated with a high concentration of iron. Edman degradation gave a mixed sequence starting with a serine residue that showed one match with a fragment termed contig275 in the internal partial genome sequence database from *Acidianus ambivalens*. The deduced amino acid sequence protein was 310 amino acids in length ($\approx 34,1$ kDa). It showed multiple predicted glycosylated sites. Four methionine codons in distances of 4, 8, 30 and 41 amino acids were identified upstream of the *sbp* gene. Primer extension analysis showed that the transcriptional start point was 9 nt upstream of the second Met codon. A TATA box and a BR element were present in a distance typical for Archaea upstream of the start point. The 30 aa upstream of the protein start had the typical composition of a secretory leader peptide consisting of an N-domain with two lysine residues and a hydrophobic H-domain with a predicted alpha helix as sequence motifs. It was tried to overexpress the *sbp* gene in *E. coli* and to purify the protein with column chromatography but with negative results. Western analysis also gave no result. Southern hybridization of genomic *A. ambivalens* DNA gave three independent bands, so that the *sbp* gene is eventually present in three copy. Northern hybridization showed that the *sbp* RNA was expressed during the complete growth

cycle during aerobic sulfur metabolism. The size of the mRNA was four times longer than the sbp gene pointing to the presence of an operon with other yet unidentified genes.